

**UNTERSUCHUNGEN ZUR AEROBEN UND
FAKULTATIV ANAEROBEN BAKTERIELLEN FLORA
DES INTESTINALTRAKTS VON KARPFFEN
(CYPRINUS CARPIO L.)**

Gerhard Bausewein

Disbui. München
1988



Als ich das erste Mal in die Schule ging, war ich sehr nervös und hatte viele Fragen.

Mein Name ist ...

Ich bin ... Jahre alt.

Ich habe viele Freunde und wir spielen oft zusammen.

Meine Eltern sind sehr lieb zu mir.

Ich möchte einmal eine große Frau werden und
vielleicht eine Lehrerin sein. Ich möchte
auch viele neue Freunde finden und
mit ihnen viel Spaß haben.

Für meine Eltern

Ich danke euch sehr für alles, was ihr für mich tut.

Ich liebe euch sehr und hoffe, ich werde bald wieder bei euch sein.

Ich bin ...

...

...

Aus dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf
Prof. Dr. W. Ahne

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

Untersuchungen zur aeroben und
fakultativ anaeroben bakteriellen Flora
des Intestinaltrakts von Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) *

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Gerhard Bausewein
aus
Oberscheinfeld

* Diese Untersuchungen wurden aus Mitteln des Bayerischen
Staatsministeriums für Wissenschaft und Kunst gefördert.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: _____ Prof. Dr. Dr.habil. R. Hoffmann

Korreferent: _____ Prof. Dr. J. Wittmann

Tag der Promotion: _____ 26. Februar 1988



drucken + binden
gmbh
Schellingstraße 23
8000 München 40
☎ 089/28 44 45

I n h a l t

=====

1.	<u>Einleitung</u>	3
2.	<u>Literaturübersicht</u>	4
2.1.	Untersuchungen der Darmflora von Karpfen	4
2.2.	Untersuchungen über die Darmflora anderer Fischarten	7
2.2.1.	Meeresfische	7
2.2.2.	Süßwasserfische	11
3.	<u>Material und Arbeitsmethoden</u>	18
3.1.	Art und Herkunft der untersuchten Fische	18
3.2.	Probengewinnung	21
3.3.	Zusammensetzung der verwendeten Medien, bzw. Nährböden	22
3.4.	Untersuchungsmethoden	24
4.	<u>Ergebnisse</u>	28
4.1.	Aeromonas sp.	28
4.2.	Pseudomonas sp.	32
4.3.	Achromobacter sp./Alcaligenes sp./ Pseudomonaden ungeklärter Zuordnung	34
4.4.	Flavobacter sp.	36
4.5.	Enterobacteriaceae	37
4.5.1.	Enterobacter agglomerans	37
4.5.2.	Escherichia coli	38
4.5.3.	Citrobacter freundii	39
4.5.4.	Nicht identifizierte Enterobacteriaceae	39
4.6.	Cytophaga sp./Flexibacter sp. (syn. Myxobacter sp.)	40
4.7.	Acinetobacter sp.	40
4.8.	Lactobacillus sp.	41
4.9.	Nicht identifizierte Gram-positive Stäbchen	43
4.10.	Saisonelle und geographische Verteilung der isolierten Bakterien	44

5.	<u>Diskussion</u>	46
5.1.	Aeromonaden	48
5.1.1.	Bewegliche Aeromonaden	48
5.1.2.	Unbewegliche Aeromonaden	49
5.2.	Pseudomonaden	53
5.3.	Achromobacter sp./Alcaligenes sp./ Pseudomonaden ungeklärter Zuordnung	55
5.4.	Flavobacter sp.	55
5.5.	Enterobacteriaceae	56
5.6.	Cytophaga sp./Flexibacter sp.	59
5.7.	Acinetobacter sp.	60
5.8.	Lactobacillus sp.	60
5.9.	Verteilung der isolierten Bakterien	62
6.	<u>Zusammenfassung</u>	65
7.	<u>Summary</u>	66
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	67

1. Einleitung

Die Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora von Fischen wurde bereits in einer Vielzahl von Arbeiten zu bestimmen versucht, wobei die Arten der untersuchten Fische ebenso vielfältig waren wie die Zielsetzungen dieser Arbeiten. In erster Linie geschah dies unter lebensmittelhygienischen Gesichtspunkten, v. a. um die Bedeutung und Beteiligung der Bakterien am Fischverderb zu klären. Der Schwerpunkt solcher Untersuchungen lag somit bei kommerziell genutztem Seefisch und der Bestimmung der Keimflora von Haut, Kiemen und in einigen Fällen auch der des Darms.

Mit der Zunahme von intensiv gehaltenen Süßwasserfischen und damit häufiger auftretenden seuchenhaft verlaufenden Krankheitsausbrüchen stieg das Interesse an der Mikroflora von Süßwasserfischen. Besonders in der letzten Zeit wurde verstärkt daran gearbeitet, Aufschluß über eine eigenständige Darmflora von Fischen zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit war es, die Zusammensetzung der aeroben oder fakultativ anaeroben Keimflora des Verdauungstrakts von Karpfen unter unterschiedlichen Umweltbedingungen zu bestimmen. Neben der Frage nach der Zusammensetzung der Darmflora lag das Augenmerk auf jahreszeitlich bedingten Verschiebungen sowie Abhängigkeiten von Nahrungsangebot oder geographischer Herkunft. Besonderes Interesse galt auch dem Vorkommen (fakultativ) fischpathogener Keime, die der Karpfen möglicherweise in seinem Darmtrakt beherbergt, ohne selbst notwendigerweise zu erkranken.

2. Literaturübersicht

2.1. Untersuchungen der Darmflora von Karpfen

KREMPL (1959) untersuchte die Darmflora von 25 Karpfen aus sieben Gewässern Österreichs. Dabei entnahm er die Keime aus drei Abschnitten des Darmkanals und überprüfte deren Wachstumsverhalten auf unterschiedlichen Nährmedien und bei verschiedenen Temperaturen. Weiterhin testete er eine Reihe biochemischer Reaktionen. Die Bestimmung der Keime erfolgte nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957). Von 172 Reinkulturen wurden 80 näher bestimmt, wobei es ohne Bedeutung blieb, aus welchem Teil des Darmes die Proben stammten.

Eine ähnliche Feststellung traf GOLDMANÓWA (1927) bei ihrer Untersuchung der Darmflora von 28 Karauschen. Auch hier erwies sich die Zusammensetzung des Keimspektrums als unabhängig von der Lokalisation innerhalb des Darmkanals.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Darmflora des Karpfens nach KREMPL (1959)

Zahl der isolierten Keime		80
davon	Aeromonaden	44
	Vibrionen	15
	Aerobacter sp.	6
	gram-pos. Kokken	10
	E.coli	4
	Bacillus sp.	1

Im Rahmen einer Arbeit zur Bakterienökologie im Darm von Süßwassernutzfischen untersuchte MATTHEIS (1964) u.a. auch den Darm von 13 Karpfen.

Dabei fand er neben Aeromonaden v.a. Pseudomonaden, *Achromobacter* sp., *Paracolonobactrum* sp. und *Aerobacter* sp.. Ein großer Teil der Pseudomonaden wurde als *Pseudomonas fluorescens* identifiziert. PASSOVSKY (1939) und KREMPL (1959) konnten dagegen keine Fluoreszenten im Karpfendarm feststellen.

Nach der Meinung von MATTHEIS muß offenbleiben, ob es sich bei den gefundenen Keimen um eine eigenständige Flora des Fischdarms handelte.

SAVVIDIS (1984) erforschte das Vorkommen von Enterobakterien im Verdauungstrakt von Süßwasserfischen. Von insgesamt 290 untersuchten Fischen waren 125 Cypriniden (81 Karpfen). Es handelte sich sowohl um tote und kranke als auch um gesunde Fische. SAVVIDIS wies Enterobakterien im Darm von 26 Cypriniden (entspricht 20 %) nach.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Enterobacteriaceae im Darm von Karpfen nach SAVVIDIS

Isolierte Enterobakterien		35
davon	<i>Enterobacter</i> sp.	16
	<i>Citrobacter</i> sp.	11
	<i>Proteus vulgaris</i>	6
	nicht identifiz.	2

Fischpathogene Vertreter der Enterobacteriaceae, wie beispielsweise *Yersinia ruckeri* oder *Edwardsiella tarda*, konnten aus dem Darm von Cypriniden nicht isoliert werden.

Von Mai bis Oktober 1970 führte AOKI (1974) eine Studie über das Vorkommen Antibiotika-resistenter Keime bei Karpfen durch. Dabei untersuchte er neben dem Darmtrakt der Fische auch die Keimflora von fünf Karpfenteichen in Shioda Town, Japan.

Aus dem Darmtrakt der 64 untersuchten Karpfen (311 Keime) isolierte AOKI v.a. *Aeromonas liquefaciens* (syn. *Aeromonas hydrophila*) (78,5 %), *Pseudomonaden* (15,8 %) und *Enterobacteriaceae* (5,2 %). Die prozentuale Verteilung der Keime aus den Karpfenteichen (247 Isolate) lag bei: *Aeromonaden* 73,3 %, *Pseudomonaden* 22,3 % und *Enterobakterien* 3,2 %.

Aeromonaden und *Pseudomonaden* fanden sich während des gesamten Untersuchungszeitraums sowohl im Wasser als auch im Darm der Fische. Lediglich bei Vertretern der *Enterobacteriaceae* gab es Unterschiede zwischen der Keimflora des Wassers und der des Karpfendarms. So wurden in zwei Fällen *Escherichia coli* aus dem Darm isoliert, ohne daß diese Keime im Wasser nachweisbar waren.

Im Verlauf der Untersuchung wurden in drei Teichen Sulfonamide gegen bakterielle Infektionen eingesetzt. Übertragbare Resistenzfaktoren fanden sich bei 189 der 425 isolierten *Aeromonaden* und bei zwei der 25 isolierten *Enterobakterien*. Die meisten der Keime waren resistent gegenüber Sulfonamiden und Tetracyclinen.

2.2. Untersuchungen über die Darmflora anderer Fischarten

2.2.1 Meeresfische

Wie bereits in der Einleitung angesprochen, erfolgte die Untersuchung der bakteriellen Mikroflora von Speisefisch zunächst aus lebensmittelhygienischen Gründen.

So erforschten ASCHEHOUG und VESTERHUS (1944) die Zusammensetzung der bakteriellen Flora von Schleim, Kiemen und Darm bei 37 Heringen. Von 231 isolierten Kulturen stammten allerdings nur 29 aus dem Darm. 21 Keime wurden als *Achromobacter* sp., sieben als *Pseudomonas* sp. und eine als Mikrokokken identifiziert. Strikte Anaerobier konnten nicht isoliert werden.

Eine ähnlich hohe Anzahl *Achromobacter*-Keime fand STEWART (1932) im Darm von Schellfisch. Weiterhin wies er in fast jedem Fisch einzelne sporenbildende Bakterien nach. In einer Arbeit von REED und SPENCE (1929) hingegen stellte sich die prozentuale Verteilung der Keime in der Darmflora von Schellfisch anders dar. So fanden beide Wissenschaftler einen dominierenden Anteil an *Proteus*-Keimen (ca. 70 %), gefolgt von *Pseudomonaden*, *Bacillus* sp. und *Flavobacter* sp., während der Anteil der *Achromobacter*-arten dagegen unter 5 % lag.

WATANABE (1960) untersuchte die bakterielle Kontamination von Dorschen, die er auf zwei Kopenhagener Fischmärkten kaufte. Er fand heraus, daß bei diesen Fischen Keime der *Achromobacter*/*Pseudomonas*-Gruppe etwa 60 - 70 % der Hautflora ausmachten, ohne diese Keime aus dem Darm isolieren zu können. Im Verdauungstrakt fanden sich dagegen *E.coli*, Mikrokokken, *Bacillus*-Arten, coryneforme Keime und Vibrionen.



LISTON (1954, 1956 und 1957) analysierte in umfangreichen Untersuchungen die Bakterienflora von Plattfischen. Dabei vertrat er die Meinung, daß die Darmflora von Fischen aufgrund ihrer "geschützten" Lage äußeren Einflüssen weniger stark ausgesetzt sei, als beispielsweise die Hautflora. Diese könne durch die Fangmethode oder ähnliche äußere Manipulationen stärker verändert werden. Daneben stellte LISTON (1956) fest, daß sich die bakterielle Darmflora von Plattfischen kaum von der Flora der Rundfische unterschied.

Detaillierte Angaben über das Bakterienspektrum des Verdauungstrakts von Plattfischen liefert die 1957 publizierte Arbeit, in der die Ergebnisse einer Untersuchung an Rochen und Seezungen veröffentlicht werden.

In der prozentualen Verteilung der isolierten Keime stehen die Vibrionen mit ca. 70 % an erster Stelle. Daneben finden sich *Pseudomonaden*, *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp. und *Corynebakterien* (jeweils weniger als 10 %), sowie vereinzelt *Flavobakterien*. Bemerkenswert ist, daß Vibrionen in wesentlich geringerem Umfang auf Haut und Kiemen vertreten waren. Hier setzten sich 75 % der Flora zu etwa gleichen Teilen aus *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp. und *Alcaligenes* sp. zusammen.

GILMOUR et al. (1976) bestimmten die Darm- und Hautflora von Schollen. Interesse bestand v.a. an der Auswirkung bestimmter Futtermittelzusätze auf die Darmflora dieser in Becken gehaltenen Fische. Zur Intestinalflora zählten neben den bereits von LISTON beschriebenen Keimen auch *Aeromonaden* und Gram-positive Kokken. Angaben über die prozentuale Verteilung der isolierten Bakterien wurden jedoch nicht gemacht.

Ähnliche Ergebnisse hatten auch Untersuchungen von CAMPBELL und BUSWELL (1983) an Seezungen erbracht.

Eine Reihe von Untersuchungen befaßte sich daneben auch mit der Bakterienflora von Rundfischen.

So erforschte COLWELL (1960) die Mikroflora verschiedener Meeresfische (Dorsch, Seezunge, Barsch u.a.) aus dem Puget Sound bei Seattle, USA. Die Probenentnahme erfolgte von Haut, Maul, Kiemen und mittels über den Anus eingeführter Tupfer auch vom Darm. Dominierende Keime waren Pseudomonaden, mit den höchsten prozentualen Anteilen sowohl im Darm (48 %), als auch im Maul (68 %), auf der Haut (44 %) und auf den Kiemen (45 %). Die Darmflora setzte sich außerdem zusammen aus *Achromobacter* sp., *Flavobacter* sp., Vibrionen, Enterobakterien, Corynebakterien und *Bacillus*-Arten.

NEWMAN et al. (1972) untersuchten dagegen die Darmflora von 65 Blaubarschen aus dem Long Island Sound in der Nähe New Yorks. Von 626 isolierten Keimen konnten 433 nach SHEWAN et al. (1960) identifiziert werden. Auch hier setzte sich die Darmflora vorwiegend aus Vibrionen, Pseudomonaden, Enterobakterien und *Achromobacter* sp. zusammen.

Genauere Angaben über die prozentuale Verteilung dieser Keime finden sich in Tabelle 3.

Weitere umfangreiche Erkenntnisse über die Darmflora von Meeresfischen lieferten besonders die Untersuchung verschiedener japanischer Forscher.

So analysierten AISO et al. (1968) im Hinblick auf möglicherweise vorhandene Lebensmittelvergifter die Darmflora von Makrelen, die sie auf zwei japanischen Fischmärkten kauften. Dabei stellte man fest, daß im Magen der Fische eine vielfältige Flora zu finden war (Vibrionen, Pseudomonaden, *Achromobacter* sp., *Flavobacter* sp., *Sarcinia* sp., Corynebakterien und *Bacillus*-Arten), während im Darm neben den vorherrschenden Vibrionen (über 90 %

der Gesamtflora) nur Pseudomonaden vorhanden waren. AISO et al. führten die Anhäufung der Vibrionen im unteren Teil des Verdauungstrakts auf eine höhere Gallensalztoleranz dieser Keime zurück.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Arbeiten von OKUZUMI und HORIE (1969) sowie von SERA et al. (1979 a und b). Sie beschrieben Vibrionen als dominierende Keime im Verdauungstrakt verschiedener Meeresfische (Makrelen, Thunfischartige, Brachsenartige u.a.) OKUZUMI und HORIE wiesen darauf hin, daß alle ihrer isolierten Vibrionen auf Nährmedien mit einem Salzgehalt von 3 % wuchsen, während auf herkömmlichen Nährmedien ohne Salzzusatz kein Wachstum stattfand.

UGAJIN (1979) untersuchte die Darmflora verschiedener Salmoniden in Süßwasser- und Salzwasserhaltung. Alle Isolate von Königsachsen (Seewasserhaltung) wurden dabei als Vibrionen identifiziert. Im Gegensatz dazu fanden sich im Darmtrakt von Kirschenachsen (Süßwasserhaltung) Aeromonaden (*Aeromonas hydrophila*) und Enterobakterien (*Hafnia alvei*).

In gleicher Weise erforschten SAKATA et al. (1980) die Intestinalflora von Tilapia. Diese in Japan sehr bedeutenden Nutzfische kamen sowohl aus Süßwasser- als auch Salzwasserbecken. Aus dem Darm der in Süßwasser gehaltenen Fische wurden 125 Keime isoliert. Davon waren ca. 80 % Aeromonaden, 10 % Vibrionen, 7 % Pseudomonaden und 3 % Enterobakterien. Bei denen aus Salzwasser waren dagegen 67 % der Darmkeime Vibrionen, 30 % Aeromonaden und 3 % Pseudomonaden.

Daneben wurde auch das Keimspektrum des Wassers und des Futters (kommerzielles Pelletfutter) analysiert. Dabei waren die Mehrzahl der im Süßwasser vorhandenen Keime Flavobakterien. Im Futter dagegen fanden sich nur Bacillus-

Keime gefunden. Beide Keimarten konnten jedoch nicht im Darm der Fische nachgewiesen werden.

2.2. . Süßwasserfische

MARGOLIS (1952) erforschte die Bakterienflora von Hechten aus Lake Monroe, Quebec, Kanada. Dabei isolierte er aus dem Darm von 16 Fischen v.a. Pseudomonaden, Achromobacter sp. und Proteus-Arten, sowie vereinzelt E. coli. Die Flora der Haut erwies sich als vergleichsweise vielfältiger, da neben den eben genannten Keimen auch Alcaligenes sp., Flavobacter sp., Mikrokokken und nicht-sporenbildende Gram-positive Stäbchen gefunden wurden. Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Flora in verschiedenen Abschnitten des Darmkanals waren nicht feststellbar.

AOKI und WATANABE (1973) untersuchten - ähnlich der in Kapitel 2.1. erwähnten Arbeit - auch das Vorkommen Antibiotika-resistenter Keime in Darmtrakt von Aalen. Außerdem analysierten sie das Keimspektrum der Teiche, aus denen die untersuchten Fische stammten. Dabei isolierten sie aus dem Darm von 61 Aalen insgesamt 426 Keime. Dominierende Bakterien waren Pseudomonaden, Aeromonaden und Enterobakterien, gefolgt von Alcaligenes sp. und Vibrionen. Zum Keimspektrum der Teiche zählten ebenfalls v.a. Pseudomonaden, Aeromonaden und Enterobakterien. Von den gefundenen Bakterien waren besonders Aeromonaden, Enterobakterien und Vibrionen resistent gegenüber Tetracycline und Sulfonamide.

Ähnliche Ergebnisse lieferte eine weitere Studie von AOKI (1975), die sich mit dem Vorkommen Antibiotika-resistenter Keime im Darmtrakt von Ayu beschäftigte. Dabei erwiesen sich v.a. Aeromonaden und Enterobakterien

als resistent gegenüber Chloramphenicol. In Teichen mit regelmäßigem Einsatz von Chemotherapeutika war die Anzahl resistenter Keime wesentlich höher als in solchen ohne.

TRUST und SPARROW (1974) untersuchten die Darmflora mehrerer Salmoniden-Arten (Regenbogenforellen, Rothalsforellen, Hakenlachse, Ketalachse) von 16 Standorten in British Columbia, Kanada. Dabei zeigten sich bei 121 wildlebenden Fischen trotz unterschiedlicher geographischer Herkunft, verschiedener Gewichtsklassen und Fischarten keinerlei signifikante Abweichung in der Zusammensetzung der Darmflora. Ebenso hatten eine Probeentnahme in unterschiedlichen Darmabschnitten sowie der Transport der Fische ins Labor keine erkennbaren Verschiebungen der Ergebnisse zur Folge.

Zu den vorherrschenden Keimarten zählten Enterobakterien (44 %), Aeromonaden (13 %), Acinetobacter sp. (5 %), Gram-positive Kokken (15 %) und Pseudomonaden (9 %).

Da nach Meinung der Autoren Untersuchungen unter Feldbedingungen schlecht vergleichbar und damit nur bedingt aussagekräftig sind, führte TRUST (1975) eine weitere Studie an 90 Ketalachsen durch. Die Fische wurden nun unter definierten Laborbedingungen mit kontrollierter Wasser- und Futterqualität gehalten, um unterschiedliche Umwelteinflüsse soweit wie möglich auszuschalten. Mit der Bestimmung der Darmflora erfolgte eine gleichzeitige Untersuchung von Wasser und Futter. Daneben wurde auch die Darmflora von hungernden und mit sterilisiertem Futter ernährten Fischen analysiert.

Aus dem Verdauungstrakt von 32 "normal" gefütterten Fischen wurden 343 Keime isoliert. Die dominierenden Arten waren Aeromonaden (ca. 20 %), Bacillus-Arten (ca. 30 %), Mikrokokken (ca. 10 %), Pseudomonaden (ca.

20 %), sowie *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp. und *Flavobakterium*. Die hohe Anzahl der gefundenen *Bacillus*-Arten führte der Autor auf eine sehr hohe Belastung des Futters mit diesen Keimen zurück. Bakterien der *Salmonella*/*Shigella*-Gruppe, *Lactobazillen* und *Enterokokken*, sowie *Clostridien* und strenge *Anaerobier* konnten trotz entsprechender Isolierungstechniken nicht gefunden werden. In der bis zu 75 Tage dauernden Hungerperiode und während der Fütterung mit sterilisierter Nahrung sank zwar der Keimgehalt von 10^7 auf 10^5 Keime/g Darminhalt, ein "steriler" Darm wurde aber bei diesen Lachsen nicht gefunden. Dies widersprach der Aussage von MARGOLIS (1953), 'ein hungernder Fisch besäße einen annähernd sterilen Darm'. Zu einer ähnlichen Feststellung war HUNTER (1920) gekommen, der den Darm wandernder Lachse als steril ansah, 'da die Fische während dieser Zeit keinerlei Futter aufnehmen würden'.

YOSHIMIZU (1976 a und b) führte ebenfalls Untersuchungen an verschiedenen *Salmoniden*-Arten durch, bei denen neben der Flora des Darms auch die des Gewässers analysiert wurde. Dabei zeigte sich, daß die Bakterienzahl im Fischdarm (10^4 bis 10^7 Keime/g Darminhalt) immer deutlich höher als die des umgebenden Gewässers (10^3 /ml) war, ohne daß es zu jahreszeitlich bedingten Verschiebungen kam. Während sich die Gewässerbakterien hauptsächlich aus *Flavobakterien*, *Cytophaga* sp., *Achromobacter* sp. und *Pseudomonaden* zusammensetzten, dominierten in der Darmflora *Aeromonaden* und *Enterobakterien* (Süßwasser), sowie *Vibrionen* (Salzwasser).

Eine Übersicht über die prozentuale Verteilung der Keime gibt Tabelle 3.

NIETO (1984) analysierte die Bakterienflora von Kiemen, Darm, Leber und Niere von Regenbogenforellen aus zwei spanischen Fischfarmen. Zu den dominierenden Darmkeimen zählten v.a. Aeromonaden und Enterobakterien. Daneben wurden Pseudomonaden, Vibrionen, Gram-positive Kokken und Vertreter der Species *Flavobacter*, *Cytophaga*, *Moraxella* und *Acinetobacter* gefunden (vgl. Tabelle 3).

Weder NIETO noch andere Autoren gaben Hinweise auf das Vorkommen fischpathogener Keime, wie beispielsweise *Aeromonas salmonicida* oder *Yersinia ruckeri*.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die prozentuale Verteilung der Keime an der Gesamtflora des Intestinaltrakts, soweit dies aus den Angaben der bisher zitierten Autoren ersichtlich war.

GELDREICH und CLARKE (1966) befaßten sich mit der Frage, ob das Vorkommen von Fäkalstreptokokken und Colibakterien im Fischdarm als Indikator für eine bestehende Wasserver-
schmutzung zu werten sei. Dies würde voraussetzen, daß solche Bakterien normalerweise nicht im Intestinaltrakt zu finden sind.

Die Autoren untersuchten daher den Darm von 78 Fischen verschiedener Arten (Barsche, Katzenwelse, Karpfen u.a.) aus mehreren Abschnitten des Little Miami River, USA. Bei der Auswertung stellten sie fest, daß die meisten Fische aus verschmutzten Flußabschnitten coliforme Keime und Fäkalstreptokokken im Darm beherbergten. Weiterhin fanden sie heraus, daß die Bakteriendichte dieser Keime im Darm immer wesentlich höher war als im umgebenden Gewässer. Als mögliche Ursachen stellten die Autoren entweder eine bakterielle Kontamination der Nahrung und eine damit verbundene Akkumulation im Darm, oder aber eine eigenständige Bakterienvermehrung im Fischdarm zur Diskussion. Entsprechende Versuche aber hatten ergeben, daß eine deutliche Vermehrung von Fäkalstreptokokken erst in Temperaturbereichen von über 20°C stattfand. Nach Meinung der Autoren können im Darm auch gewisse kompetitive Situationen entstehen. So sollen beispielsweise manche Blaualgenarten oder auch Pseudomonaden zu einer Wachstumshemmung von *E.coli* führen.

In einem weiteren Versuch, bei welchem Fäkalkeime als Tracerkeime eingesetzt wurden, zeigten GELDREICH und CLARKE, daß diese Keime - eine entsprechend hohe Wasserbelastung vorausgesetzt - noch nach 9 bis 14 Tagen im Fischdarm nachzuweisen waren.

Tabelle 3: Prozentuale Verteilung der isolierten
Keime nach den Angaben einiger zitierter
Autoren

LISTON (1957))	Rochen	MW
LISTON (1957)	Seezungen	MW
COLWELL (1962)	Dorsche, Barsche u.a.	MW
AISO (1968)	Makrelen	MW
OKUZUMI und HORIE (1969)	Makrelen u.a.	MW
NEWMAN (1972)	Blaubarsche	MW
YOSHIMIZU (1976 a)	Königs- und Masou-Lachse	MW
SAKATA (1980)	Tilapia	MW
AOKI u. WATANABE (1973)	Aale (61)	SW
AOKI (1974)	Karpfen (64)	SW
AOKI (1975)	Ayu	SW
TRUST u. SPARROW (1974)	versch. Salmoniden (121)	SW
TRUST (1975)	Ketalachse (32)	SW
YOSHIMIZU (1976 a)	Königs- und Masou-Lachse	SW
YOSHIMIZU (1976 b)	Masou-Lachse (13)	SW
YOSHIMIZU (1976 b)	Masou-Lachse (20)	SW
SAKATA (1980)	Tilapia	SW
NIETO (1984)	Regenbogenforellen	SW

Anm.: - Alle Prozentangaben sind auf ganze Zahlen gerundet.

- Falls die Anzahl der untersuchten Fische bekannt
ist, wird deren Zahl hinter dem Namen der Fische
in Klammern angegeben.

- MW : Meerwasserhaltung, SW : Süßwasserhaltung

Aeromonas	Pseudomonas	Enterobakterien	Vibrien	Achromobacter sp.	Flavobacter sp./ Cytophaga sp.	Gram-positive Kokken	Corynebakterien	Bacillus sp.	Isolate, gesamt
0	11	0	74	3	2	4	3	0	
0	6	0	59	8	1	5	13	0	
0	48	3	14	18	2	5	1	5	
0	5	0	60	12	3	0	5	2	57
0	0	0	100	0	0	0	0	0	
0	22	21	28	18	2	1	0	0	433
0	0	0	88	5	0	0	7	0	65
30	3	0	67	0	0	0	0	0	150
34	20	30	7	0	0	0	0	0	226
78	16	5	0	0	0	0	0	0	311
54	13	31	2	1	0	0	0	0	250
13	9	44	6	2	0	15	1	2	656
20	20	5	1	0	5	10	0	30	343
62	0	19	0	6	1	2	9	0	459
61	6	24	0	1	0	0	8	0	291
27	24	30	1	8	1	0	7	0	465
80	7	3	10	0	0	0	0	0	125
30	10	30	10	0	3	3	0	0	

3. Material und Arbeitsmethoden

3.1. Art und Herkunft der untersuchten Fische

Bei den untersuchten Fischen handelte es sich um Karpfen, *Cyprinus carpio* (L.), die aus verschiedenen Teichwirtschaften Bayerns mit den regionalen Schwerpunkten Mittelfranken und Oberpfalz stammten. Die Entnahme der Fische erstreckte sich auf die Monate April/Mai und September/Oktober 1986, sowie April 1987. Diese zeitliche Verteilung wurde gewählt, um einerseits eventuelle jahreszeitliche Veränderungen der Darmflora zu erkennen, andererseits weil aufgrund der saisonbedingten Abfischungen der Teiche zu diesen Zeitpunkten die Fische ohne zusätzliche Manipulationen leicht verfügbar waren.

Insgesamt wurden 190 Karpfen aus 19 Probeentnahmestellen von 12 verschiedenen Standorten untersucht, wobei je 7 Proben vom gleichen Ort zum Ende der Winterruhe sowie gegen Ende der Wachstumsphase und damit auch gegen Ende der Futteraufnahme untersucht wurden. Von jedem Betrieb wurde dabei eine Gruppe zu je 10 Fischen einer Gewichtsklasse ausgewählt. Die Größe der zufällig ausgesuchten Fische reichte von K_1 bis K_3 . Die ausgewählten Exemplare zeigten äußerlich keine erkennbaren Anzeichen von Krankheit.

Differenziertere Angaben über Art, Herkunft und Haltung der Fische geben die folgende Karte und Tabelle 4.

Übersicht über die Entnahmeorte der Karpfen in Bayern



Tabelle 4: Daten zum Untersuchungsmaterial

Fisch- bezeichnung	Entnahme	Her- kunft	Betriebsart u. -größe	Haltung bei Entnahme	Zusätzliche Fütterung	Durchschnitts- gewicht
A/1 - A/10	April 86	Mfr.	Teichwirt	0,2 ha	Fischkasten	K ₂ / 210 g
A/11 - A/20	Sept. 86	Mfr.	Teichwirt	0,2 ha	Teich	K ₃ /1570 g
B/1 - B/10	April 86	Mfr.	Teichwirt	2,5 ha	Winterung	K ₂ / 250 g
C/1 - C/10	April 86	Mfr.	Fischzucht	Winterung	-----	K ₂ / 230 g
C/11 - C/20	Sept. 86	Mfr.	Fischzucht	Teich	Fertigfutter	K ₁ / 15 g
D/1 - D/10	Mai 86	Obb.	Versuchsanst.	Winterung	-----	K ₁ / 15 g
E/1 - E/10	April 86	Opf.	Erzeugergem.	Becken	-----	K ₃ /1400 g
E/11 - E/20	April 86	Opf.	Erzeugergem.	Becken	-----	K ₃ /1650 g
F/1 - F/10	April 86	Opf.	Teichwirt	8 ha	Teich	Fertigfutter K ₁ / 20 g
F/11 - F/20	Sept. 86	Opf.	Teichwirt	8 ha	Teich	Fertigfutter K ₃ /1320 g
G/1 - G/10	April 86	Opf.	Teichwirt	11 ha	Teich	Fertigfutter K ₂ / 380 g
G/11 - G/20	Sept. 86	Opf.	Teichwirt	11 ha	Teich	Fertigfutter K ₂ / 300 g
H/1 - H/10	April 86	Opf.	Teichwirt	15 ha	Teich	----- K ₃ /1130 g
H/11 - H/20	Sept. 86	Opf.	Teichwirt	15 ha	Teich	----- K ₃ /1260 g
I/1 - I/10	Sept. 86	Opf.	Teichwirt	35 ha	Teich	----- K ₃ /1640 g
J/1 - J/10	Okt. 86	Mfr.	Teichwirt	2 ha	Teich	Getreide K ₃ /1450 g
J/11 - J/20	April 87	Mfr.	Teichwirt	2 ha	Fischkasten	----- K ₃ /1220 g
K/1 - K/10	April 87	Mfr.	Fischhandel	Becken	-----	K ₃ /1400 g
L/1 - L/10	April 87	Opf.	Teichwirt	17 ha	Teich	----- K ₂ / 240 g

Anm.: Alle mit "Teichwirt" bezeichneten Betriebe waren landwirtschaftliche Betriebe, die die Teichwirtschaft als Nebenerwerb führten.

3.2. Probengewinnung

Die ausgewählten Fische wurden sobald als möglich nach dem Abfischen aus ihrem ursprünglichen Gewässer durch Kopfschlag betäubt und anschließend durch Dekapitation getötet. Dann wurden Bauch und Seitenflächen mit trockenen Tüchern gesäubert und mehrmals mit 100 %igem denaturierten Alkohol abgerieben. Nach Eröffnung der Leibeshöhle wurde ein Stück vom letzten Drittel des Darmes mit vorher ausgeglühten Instrumenten herausgenommen und aufgeschnitten.

Die Entnahme des Darminhalts geschah mit handelsüblichen sterilen Tupfern, wobei angestrebt wurde, jeweils eine gleiche, ca. stecknadelkopfgroße Menge Darminhalt zu erhalten. Außerdem wurde durch mäßigen Druck und durch leichtes Drehen des Tupfers versucht, direkte Abstriche von der Darmschleimhaut zu erhalten, ohne den Darm selbst zu beschädigen. Letzteres war besonders bei K_1 aufgrund der Größenverhältnisse und der geringen Festigkeit der Darmwand nicht immer möglich.

Als Transportmedium diente steriles gepuffertes Peptonwasser (ca. 5 ml in verschließbaren Plastikröhrchen). Der Transport ins Labor erfolgte in einer Kühlbox bei annähernd Kühlschranktemperatur und dauerte i.d.R. weniger als 24 Stunden.

Vor der endgültigen Verimpfung auf die jeweiligen Nährböden wurden die Transportröhrchen mit den darin befindlichen Tupferproben nochmals gründlich geschüttelt, so daß sich auch am Wattetupfer klebende Teilchen (hauptsächlich von der Darmschleimhaut) im Peptonwasser lösten. Nach etwa 5 Minuten, als sich die größeren Partikel wieder vollständig abgesetzt hatten, erfolgte die Beimpfung der Nährböden mit kleiner Öse im Verdünnungsausstrich.

3.3. Zusammensetzung der verwendeten Medien, bzw. Nährböden

Gepuffertes Peptonwasser (Transportmedium)

NaCl	8,0	g/l (Aqua dest.)
KCl	0,2	
KH_2PO_4	0,12	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,91	
Pepton	10,0	

Standard-I-Nähragar (Merck)

Pepton aus Fleisch	7,8	g/l
Pepton aus Casein	7,8	
Hefeextrakt	2,8	
NaCl	5,6	
D(+)-Glucose	1,0	
Agar	12,0	

pH 7,5

Endo-Agar (Fertigplatte, Becton-Dickinson)

Thiotone Pepton	10,0	g/l
di-Kaliumhydrogenphosphat	3,5	
Lactose	10,0	
Natriumsulfit	2,5	
Fuchsin, basisch	0,5	
Agar	15,0	

pH 7,4

Columbia-CNA-Agar mit 5 % Schafblut (Fertigplatte, Becton-Dick.)

Pepton aus pankreatisch verd. Casein	11,5 g/l
Pepton aus peptisch verd. Tiergewebe	5,0
Pepton aus pankreatisch verd. Herzmuskel	3,0
Hefeextrakt	3,5
Myosate Pepton	3,0
Maisstärke	1,0
NaCl	5,0
Colistin	0,01
Nalidixinsäure	0,015
Agar	13,5
Schafblut, defibriniert	5,0 %

pH 7,3

CLED-Agar (Becton-Dickinson)

Pepton aus pankreatisch verd. Casein	4,0 g/l
Pepton aus papainisch gesp. Sojamehl	4,0
Rindfleischextrakt	3,0
Lactose	10,0
L-Cystin	0,128
Bromthymolblau	0,020
Agar	15,0

pH 7,3

Cytophaga-Agar nach Anacker und Ordal

Pepton aus Casein	0,5 g/l
Hefeextrakt	0,5
Natriumacetat	0,2
Fleischextrakt	0,2
Agar	9,0

pH 7,2

3.4. Untersuchungsmethoden

Die Bebrütung der genannten Nährböden erfolgte unter aeroben Bedingungen bei Zimmertemperatur (20 - 22°C). Auf Standard-, CLED- und Endo-Agar war ein deutliches Koloniewachstum bereits nach 24 - 48 Stunden zu erkennen. Auf Columbia-CNA-Agar nahm das Wachstum der Keime längere Zeit in Anspruch (3 - 5 Tage). Im allgemeinen wurden nur solche Kolonien berücksichtigt, die aufgrund ihrer Lage am Impfstrich und ihrer morphologischen Kriterien auf eine Reinkultur schließen ließen. Weiterhin fanden v.a. Kolonien Beachtung, welche nur selten zu finden waren. Von diesen Keimen wurde in jedem Fall versucht eine Reinkultur zu erhalten.

Die Untersuchung der ausgewählten Kolonien wurde nach folgenden Gesichtspunkten durchgeführt:

Kolonie

- Größe, Form, Farbe, Wachstumsgeschwindigkeit
- Schwarmverhalten
- Verhalten gegenüber den Nährböden (Hämolyse, Farbveränderung, Pigmentabgabe)

Keime

- Verhalten gegenüber Gramfärbung
- Form, Größe und Lage der Keime zueinander im gefärbten Präparat
- Beweglichkeit im Nativpräparat bei Phasenkontrastoptik

Oxidaserreaktion (Bactident Oxidase, Merck)

Nachweis des Enzyms Cytochromoxidase, welches reduziertes Cytochrom c oxidiert und dabei selbst reduziert wird. Eine Violettfärbung des Teststreifens zeigt eine positive Reaktion an.

Catalasereaktion

Nachweis des Enzyms Catalase, durch das als Stoffwechselprodukt anfallendes H_2O_2 in H_2O und O_2 gespalten wird. Durch Zugabe von 3 %iger H_2O_2 zu einer Bakterienmenge wird bei vorhandener Catalase Sauerstoff freigesetzt und es kommt zu einer Blasen-, bzw. Schaumbildung.

Verhalten gegenüber KOH-Lösung

Bei allen auf Columbia-CNA-Agar gewachsenen Keimen wurde der sog. KOH-Test durchgeführt. Dies ist ein Schnelltest zur Unterscheidung Gram-positiver von Gram-negativen Keimen. Während die Zellwand Gram-positiver Keime der Einwirkung einer 3 %igen Kalilauge widersteht, wird die der Gram-negativen zerstört. Die austretende DNA führt zu einer Änderung der Viskosität, was sich bei Verreiben einer solchen Kolonie in Kalilauge durch eine fadenziehende Schleimbildung erkennen läßt.

Spezialfärbungen

Bei der Untersuchung der Gram-positiven Stäbchenbakterien wurden zusätzlich die Sporenfärbung nach Rackette und z.T. die Säurefärbung nach Ziehl-Neelsen durchgeführt. Die Sporenfärbung wurde im Abstand von 4 - 6 Wochen mehrmals wiederholt.

Von diesen in ihren "Grundeigenschaften" untersuchten Kolonien gelangte eine ausgewählte Gruppe zur eigentlichen biochemischen Differenzierung. Diese Keime wurden noch ein- oder mehrmals subkultiviert, und ihre Eigenschaften in der Reinkultur geprüft.

Die Durchführung der biochemischen Reaktionen erfolgte mit Hilfe gebrauchsfertiger Testsets. Dabei handelte es sich um "Oxi/Ferm Tube" und "Enterotube" von Hoffmann-La Roche, Schweiz, sowie um "Api 20 E" und "Api 20 B" von Api Bio Merieux, Frankreich. Diese Sets wurden mit ein- bis zweitägigen, teilweise auch mit bis zu vier Tage alten Kolonien (Columbia-CNA-Agar) beimpft. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden, Kontrollen wurden aber auch nach 24 und 72 Stunden durchgeführt. Die Inkubationstemperatur lag bei Zimmertemperatur (20 - 22°C).

Mit dem genannten Testsets sind folgende Reaktionen nachweisbar:

Aerober Glucoseabbau 1,3,4)

Anaerober Glucoseabbau 1,2)

Nachweis von Lysindecaboxylase 2,3)

Ornithindecaboxylase 2,3)

Arginindihydrolase 1,3)

β -Galactosidase 3,4)

Phenylalanindeaminase 2)

Tryptophandesaminase 3)

Gelatinase 3,4)

Urease 1,2,3,4)

Nitratreduktion 4)

Voges-Proskauer-Reaktion 2,3,4)

Dulcitol 2)

Indolproduktion 1,2,3,4)

Verwertung von Citrat als einziger Kohlenstoffquelle 1,2,3,4)

Spaltung von Lactose 2)

Xylose 1)

Saccharose 3,4)

Fructose 4)

Galactose 4)

Maltose 4)

Rhamnose 3,4)

Mannose 4)

Melibiose 3)

Arabinose 2,3,4)

Adonitol 2)

Mannitol 3,4)

Sorbitol 2,3,4)

Glycerol 4)

Inositol 3)

Amygdalin 3,4)

Anm.: 1) Oxi/Ferm Tube

2) Enterotube

3) Api 20 E

4) Api 20 B

Die Auswertung der Reaktionsergebnisse erfolgte mit Hilfe der von den Herstellern gelieferten Computer-Codierlisten und den Angaben aus Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984 und 1986), sowie den Angaben von COWAN und STEEL (1970) und AUSTIN und AUSTIN (1987).

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden insgesamt 190 Karpfen untersucht, die in 19 Gruppen zu je 10 Fischen zusammengefaßt waren. Dabei fand die Untersuchung der Darmflora bei 11 Gruppen zum Ende der Winterruhe und bei 8 Gruppen gegen Ende des Sommers statt. Die Herkunft der Fische und der genaue Zeitpunkt der Probenentnahme ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Von allen aus dem Darm der Karpfen isolierten Bakterien wurden 579 Keime aufgrund ihrer morphologischen (Keimform, Gramverhalten, Beweglichkeit etc.) und kulturellen Eigenschaften (Kolonieform, Oxidasereaktion, Catalasereaktion etc.) den in den folgenden Kapiteln genannten Bakteriengruppen zugeordnet. Von diesen Gruppen wurde eine möglichst repräsentative Auswahl von 219 Keimen auf ihr biochemisches Reaktionsverhalten untersucht. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten dargestellt. 33 der biochemisch untersuchten Keime konnten nicht identifiziert werden.

4.1. Aeromonas sp.

In 79 % der Fische fanden sich gramnegative, Oxidase-positive Stäbchen, die als Aeromonaden eingestuft wurden. Sie wuchsen auf Standard-I-Nähragar als mittelgroße, ockerfarbene Kolonien. Auf CLED-Agar bildeten sie kleine, agarfarbene bis hellblaue Formen, während sie auf Endo-Agar als kleine, intensiv rosa bis hellrote Kolonien wuchsen. Dabei wurden sowohl bewegliche als auch unbewegliche Keime gefunden, welche in unterschiedlicher Verteilung in fast allen Fischgruppen vertreten waren.

Der Anteil der unbeweglichen Vertreter betrug ca. 21 % der als Aeromonaden identifizierten Keime. Dabei wurden lediglich in drei Fischgruppen (D/1 - D/10, F/1 - F/10 und I/1 - I/10) keine unbeweglichen Aeromonaden beobachtet. Ausgesprochene regionale oder saisonelle Unterschiede hinsichtlich ihrer Verteilung waren nicht zu erkennen. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Verteilung der beweglichen und unbeweglichen Aeromonaden innerhalb der untersuchten Fischgruppen.

Die beweglichen Vertreter der Aeromonaden wurden als *Aeromonas hydrophila*, die unbeweglichen als *Aeromonas salmonicida* ssp. nova klassifiziert.

Eine Aufstellung der biochemischen Reaktionen dieser Keime geben die Tabellen 5 und 6. Die Catalasereaktion verlief nur bei ca. 70 % der untersuchten Aeromonaden positiv, jedoch wurden alle übrigen Kriterien erfüllt, welche eine Zuordnung zu den Aeromonaden bedingten.

Tabelle 5: Biochemische Reaktionen der isolierten Stämme von *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas salmonicida* ssp. nova*

	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. nova
Oxidase	+	+
Catalase	d	d
Beweglichkeit	+	-
Glucose, aerob	+	+
Glucose, anaerob	+	+
Arginindihydrolase	+	+
N ₂ -Bildung	-	-
H ₂ S-Bildung	d	-
Xylose	-/a	-/a
Indol-Bildung	-	-
Urease	-	-
Citrat	d	d

Anm.: * getestet mit Oxi/Ferm Tube, Roche

d : variable Reaktion

-/a : negative, bzw. alkalische Reaktion

Tabelle 6: Biochemische Reaktionen der isolierten Stämme von *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas salmonicida* ssp. nova, sowie eines Referenzstammes von *Aeromonas salmonicida* ssp. salmonicida (ATTC 14174)*

	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aerom. salm. ssp. nova</i>	<i>Aerom. salm. ssp. salm. (ATTC 14174)</i>
Oxidase	+	+	+
Catalase	d	d	-
Beweglichkeit	+	-	-
β -Galactosidase	+	-	-
Arginindihydrolase	+	+	-
Lysindecaboxylase	+	-	-
Ornithindecaboxylase	-	-	-
Citrat	+	+	+
H ₂ S-Bildung	d	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophandesaminase	-	-	-
Indolproduktion	+	-	-
Voges-Proskauer	+	-	-
Gelatinase	+	+	+
Glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-

	Aeromonas hydrophila	Aerom. salm. ssp. nova	Aerom. salm. ssp. salm. (ATCC 14174)
Rhamnose	-	-	-
Saccharose	+	-	-
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	d	-	-
Arabinose	-	-	-

Anm: * getestet mit Api 20 E
d : variable Reaktion

4.2. Pseudomonas sp.

Die Morphologie und das biochemische Reaktionsverhalten von 48 untersuchten Keimen ließen deren Zuordnung zu den Pseudomonaden zu. Davon waren 27 Stämme H_2S -positiv und wurden deshalb als *Pseudomonas putrefaciens* angesehen. Diese Keime wuchsen auf Standard-I-Nähragar als große (> 5 mm), helle, ockerfarbene Kolonien. Auf CLED-Agar bildeten sie mittelgroße, grünlich-blaue Formen, während sie auf Endo-Agar ebenfalls als mittelgroße, agarfarbene hellrosa Kolonien wuchsen.

15 Stämme waren aufgrund ihres biochemischen Verhaltens zur Gruppe *Pseudomonas aeruginosa/fluorescens/putida* zu rechnen. Jedoch konnten diese Keime anhand ihrer auffallend ovalen Form auch ohne weitere biochemische

Differenzierung als *Pseudomonas putida* (syn. *Pseudomonas ovalis*) identifiziert werden. Keime dieser Gruppe waren aufgrund ihrer Kolonieform auf Standard-I-Nähragar nicht von *Pseudomonas putrefaciens* zu unterscheiden. Auf CLED-Agar bildeten sie mittelgroße, hellblaue Kolonien, auf Endo-Agar wuchsen sie in hellrosa bis weißlich-rosa Formen.

Die verbleibenden Stämme waren innerhalb dieser Gruppe nicht näher einzuordnen und wurden daher als *Pseudomonas* sp. bezeichnet.

Tabelle 7: Biochemisches Verhalten der isolierten *Pseudomonaden**

	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
Keimform	gerade, schlanke gramneg. Stäbchen	plumpe, ovale gramneg. Stäbch.	gerade, schlanke gramneg. Stäbchen
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
Beweglichkeit	+	+	+
Glucose, aerob	-/a	+	+
Glucose, anaerob	-	-	-
Xylose	-/a	d	d
Arginin-dihydrolase	-	+	-
Indolproduktion	-	-	-
N ₂ -Produktion	-	-	-
H ₂ S-Bildung	+	-	-
Urease	+	-	-
Citrat	-	+	-

Anm.: * getestet mit Oxi/Ferm Tube, Roche

d : variable Reaktion

-/a : negative, bzw. alkalische Reaktion

Bei 98 % aller Fische fanden sich Keime, die in ihren morphologischen und kulturellen Eigenschaften denen der identifizierten Pseudomonaden entsprachen. Davon zeigten ca. 30 % eine plumpe, ovale Keimform wie *Pseudomonas putida*, während ca. 70 % als gerade, schlanke Stäbchen zu anderen Pseudomonaden, einschließlich *Pseudomonas putrefaciens* zu rechnen waren.

Auch bei den Pseudomonaden ließen sich keinerlei regionale oder saisonelle Unterschiede hinsichtlich ihrer Verteilung erkennen.

4.3. *Achromobacter* sp./*Alcaligenes* sp./Pseudomonaden ungeklärter Zuordnung

Eine Gruppe von 18 Keimen konnte wegen ihrer nur spärlich vorhandenen biochemischen Reaktionen nicht eindeutig zugeordnet werden. Es handelte sich dabei um schlanke, Gram-negative, Oxidase-positive Stäbchen, die auf Endo-Agar als große agarfarbene Kolonien wuchsen.

Sie wurden in einer übergreifenden Gruppe *Achromobacter*/*Alcaligenes* sp. zusammengefaßt. Allerdings können aufgrund des biochemischen Reaktionsmusters auch Pseudomonaden ungeklärter Zuordnung nicht ausgeschlossen werden.

Die biochemischen Reaktionen dieser Keime geben die Tabellen 8 und 9 wieder, eine Übersicht über die Verteilung dieser Keime liefert Tabelle 15.

Tabelle 8: Biochemische Reaktionen der Achromobacter/
Alcaligenes-Gruppe (einschließlich Pseu-
domonaden ungeklärter Zuordnung)*

Oxidase	+	Arginindihydrolase	-
Catalase	+	N ₂ -Bildung	-
Beweglichkeit	+	Indol-Bildung	-
Glucose, aerob	-/a	H ₂ S-Bildung	-
Glucose, anaerob	-	Urease	d
Xylose	-/a	Citrat	d

Anm.: -/a : negative, bzw. alkalische Reaktion

Tabelle 9: Biochemische Reaktionen der Achromobacter/
Alcaligenes-Gruppe (einschließlich Pseu-
domonaden ungeklärter Zuordnung)**

β-Galactosidase	d	Gelatinase	-
Arginindihydrolase	-	Glucose, aerob	-
Lysindecaboxylase	-	Mannitol	-
Ornithindecaboxylase	-	Inositol	-
H ₂ S-Bildung	-	Sorbitol	-
Citrat	d	Rhamnose	-
Urease	-	Saccharose	-
Tryptophandesaminase	-	Melibiose	-
Indol-Bildung	d	Amygdalin	-
Voges-Proskauer	-	Arabinose	-

Anm.: * getestet mit Oxi/Ferm Tube, Roche

** getestet mit Api 20 E

d : variable Reaktion

4.4. Flavobacter sp.

Lediglich in zwei Fällen wurden Keime als Flavobacter sp. identifiziert. Es handelte sich dabei um gerade, Gram-negative, Oxidase-positive, Catalase-positive, unbewegliche Stäbchen, die als große, hell-orange, durchscheinende Kolonien auf Endo-Agar wuchsen.

Tabelle 10: Biochemische Eigenschaften der isolierten Flavobacter sp.*

β-Galactosidase	d	Gelatinase	+
Arginindihydrolase	-	Glucose, aerob	-
Lysindecaboxylase	-	Mannitol	-
Ornithindecaboxylase	-	Inositol	-
Citrat	+	Sorbitol	+
H ₂ S-Bildung	-	Rhamnose	-
Urease	-	Saccharose	-
Tryptophandesaminase	+	Melibiose	-
Indol-Bildung	+	Amygdalin	-
Voges-Proskauer	+	Arabinose	-

Anm.: * getestet mit Api 20 E

d : variable Reaktion

4.5. Enterobacteriaceae

Eine Reihe von Gram-negativen Keimen wurde aufgrund ihrer negativen Oxydasereaktion zu den Enterobacteriaceae gerechnet. Ihre Anzahl war wesentlich geringer als die der Aeromonaden und Pseudomonaden. Insgesamt wurden 55 Enterobakterien registriert. Davon konnten 43 Stämme anhand ihres biochemischen Verhaltens, bzw. ihres Wachstumsverhaltens identifiziert werden.

Die Zusammensetzung dieser Gruppe stellte sich wie folgt dar:

4.5.1. Enterobacter agglomerans

16 Keime konnten als Enterobacter agglomerans identifiziert werden. Diese Keime wuchsen als mittelgroße, orange-gelbliche Kolonien auf Endo-Agar, bzw. als intensiv dunkelblaue auf CLED-Agar. Dabei waren sie nur sporadisch in den einzelnen Fischgruppen zu finden. Lediglich in Gruppe E/1 - E/10 waren sie viermal vertreten.

Tabelle 11: Biochemisches Reaktionsverhalten der isolierten Enterobacter agglomerans-Stämme *

Oxidase	-	Adonitol	-
Catalase	+	Lactose	-
Beweglichkeit	+	Sorbitol	d
Glucose, anaerob	+	Voges-Proskauer	d
Gasbildung	-	Dulcitol	-
Ornithindecaboxylase	-	H ₂ S-Bildung	-
Lysindecaboxylase	-	Arabinose	d
Phenylalanindeaminase	-	Urease	-
Indol-Bildung	-	Citrat	d

Anm.: * getestet mit Enterotube, Roche

d : variable Reaktion

4.5.2. Escherichia coli

In 19 Fällen wuchsen auf Endo-Agar die für E. coli typischen grünlich-metallisch glänzenden Kolonien. Auch sie kamen i.d.R. nur vereinzelt in den jeweiligen Fischgruppen vor. Lediglich in Gruppe F/11 - F/20 fanden sich in sieben von zehn Fischen Coli-Bakterien im Darm (vgl. Tabelle 15).

Bemerkenswerterweise zeigten alle biochemisch differenzierten Isolate eine positive H_2S -Reaktion. Eine Zusammenfassung der biochemischen Reaktionen dieser Keime gibt Tabelle 12.

Tabelle 12: Biochemische Reaktionen der isolierten E. coli - Stämme*

Oxidase	-	Indol-Bildung	d
Catalase	+	Adonitol	d
Beweglichkeit	d	Lactose	+
Glucose, anaerob	+	Arabinose	+
Gasbildung	-	Sorbitol	+
Lysindecaboxylase	+	Voges-Proskauer	-
Ornithindecaboxylase	-	Dulcitol	-
Phenylalanindeaminase	-	Urease	-
H_2S -Bildung	+	Citrat	d

Anm.: * getestet mit Enterotube, Roche
d : variable Reaktion

4.5.3. Citrobacter freundii

Als *Citrobacter freundii* wurden acht Oxidase-negative Keime identifiziert. Sie wuchsen auf CLED-Agar als mittelgroße gelbliche Kolonien.

Tabelle 13: Biochemische Reaktionen der isolierten *Citrobacter freundii* - Stämme *

Oxidase	-	Indol-Bildung	-
catalase	+	Adonitol	-
Beweglichkeit	+	Lactose	+
Glucose, anaerob	+	Arabinose	+
Gasbildung	-	Sorbitol	+
Lysin-decarboxylase	-	Voges-Proskauer	-
Ornithin-decarboxylase	+	Dulcitol	-
Phenylalanin-deaminase	-	Urease	-
H ₂ S-Bildung	d	Citrat	+

Anm.: * getestet mit Enterotube, Roche

d : variable Reaktion

4.5.4. Nicht identifizierte Enterobacteriaceae

Insgesamt konnten 12 als Enterobakterien eingestufte Isolate nicht eindeutig identifiziert werden. Jedoch können 8 dieser Keime möglicherweise als *Enterobacter agglomerans* eingestuft werden.

Dabei handelte es sich um Gram-negative, Oxidase-negative, Catalase-positive, bewegliche Stäbchen, die auf Columbia-CNA-Agar als mittelgroße, intensiv gelbe Kolonien wuchsen.

Diese Keime zeichneten sich lediglich durch einen anaeroben Glucoseabbau aus, während alle anderen biochemischen Reaktionen mit Enterotube, Roche negativ verliefen. Eine Zuordnung zur Gattung Flavobacter verbietet sich aus diesem Grund, da Flavobakterien (neben einer positiven Oxidasereaktion) durch einen strengen aeroben Glucoseabbau charakterisiert sind.

4.6. Cytophaga sp./Flexibacter sp. (syn. Myxobacter sp.)

In 12 Fällen wurden lange, zarte, Gram-negative Stäbchen gefunden, die im Nativpräparat gleitende Bewegungen ausführten. Allerdings wuchsen diese Keime immer in Mischkulturen mit anderen Gram-negativen Keimen (Pseudomonaden). Auch auf Cytophaga-Agar nach Anacker und Ordal gelang eine Isolierung in Reinkultur nicht. Zwar wuchsen in einigen wenigen Fällen die für Flexibacter typischen hellgrünen Kolonien, doch wurden die gesuchten Myxobakterien letztlich immer von den ebenso wachsenden Pseudomonaden verdrängt.

Dennoch berechtigt die im Nativpräparat deutlich hervorgetretene gleitende Fortbewegungsart dieser Keime ihre Zuordnung zur Gattung Cytophaga/Flexibacter.

4.7. Acinetobacter sp.

Als Acinetobacter sp. wurden vier Keime identifiziert, die als große rote Kolonien auf Endo-Agar wuchsen, und sich neben einer negativen Oxidasereaktion v.a. durch einen strengen aeroben Glucoseabbau auszeichneten. Von diesen vier Keimen kamen drei in einer Fischgruppe vor. Es handelte sich bei diesen Bakterien um Oxidase-negative, Catalase-positive, Gram-negative Stäbchen, die im Test mit Enterotube, Roche lediglich eine positive Citratreaktion zeigten. Alle anderen biochemischen Reaktionen verliefen negativ.

4.8. Lactobacillus sp.

Als Lactobazillen wurden Gram-positive, Oxidase- und Catalase-negative, unbewegliche Keime identifiziert, die sich in 76 % aller Fische fanden. Diese Keime wuchsen relativ langsam (3 - 4 Tage) als kleine (- 2 mm), weißliche Kolonien auf Columbia-CNA-Agar ohne Hämolyse.

Dabei handelte es sich um große, gerade, Gram-positive Stäbchen, die i.d.R. paarweise und in kurzen Ketten zueinander lagen, mit zunehmenden Alter häufig kokkoide Form annahmen und in einigen Fällen ein Gram-variables Verhalten zeigten. Sie waren nicht säurefest und bildeten keine Sporen. Alle Isolate bauten Glucose oxidativ und fermentativ ab.

In Anlehnung an HIU et al. (1984) wurden diese Keime als *Lactobacillus piscicola* bezeichnet.

Tabelle 14: Übersicht über die biochemischen Reaktionen der eigenen Isolate im Vergleich mit Isolaten von HIU et al. (1984) und MICHEL et al. (1986)

	eigene Isolate	HIU et al.	MICHEL et al.
Oxidase	-	-	-
Catalase	-	-	-
Beweglichkeit	-	-	-
Hämolyse	-	nt	nt
Sporenbildung	-	-	-
Glucose	F	F	F
Nitratreduktion	-	-	-

	eigene Isolate	HIU et al..	MICHEL et al.
Gelatinase	-	nt	nt
β -Galactosidase	-	d	+
H ₂ S-Bildung	-	nt	-
Indol-Bildung	-	nt	nt
Voges-Proskauer	+	+	+
Fructose	+	+	+
Saccharose	+	nt	nt
Arabinose	d	-	-
Maltose	+	+	+
Rhamnose	-	-	-
Galactose	d	d	d
Mannose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	-	-	-
Glycerol	-	d	+
Amygdalin	d	+	+
Urease	-	-	-
Citrat	-	nt	nt

Anm.: * getestet mit Api 20 B

F : fermentativer Glucoseabbau

d : variable Reaktion

nt : nicht getestet

Neben der biochemischen Differenzierung ihrer Isolate führten MICHEL et al. auch eine Reihe von Resistenztests durch. Diese zeigten, daß *Lactobacillus piscicola* resistent gegenüber Colistin und Nalidixinsäure war. Daher lassen die weitgehende Übereinstimmung in den biochemischen Reaktionen und die Ergebnisse dieser Tests eine Identifizierung der gefundenen Keime als *Lactobacillus piscicola* zu.

Lactobacillus piscicola wurde in allen Fischgruppen nachgewiesen, d.h. es waren keine regionalen oder saisonellen Unterschiede ersichtlich.

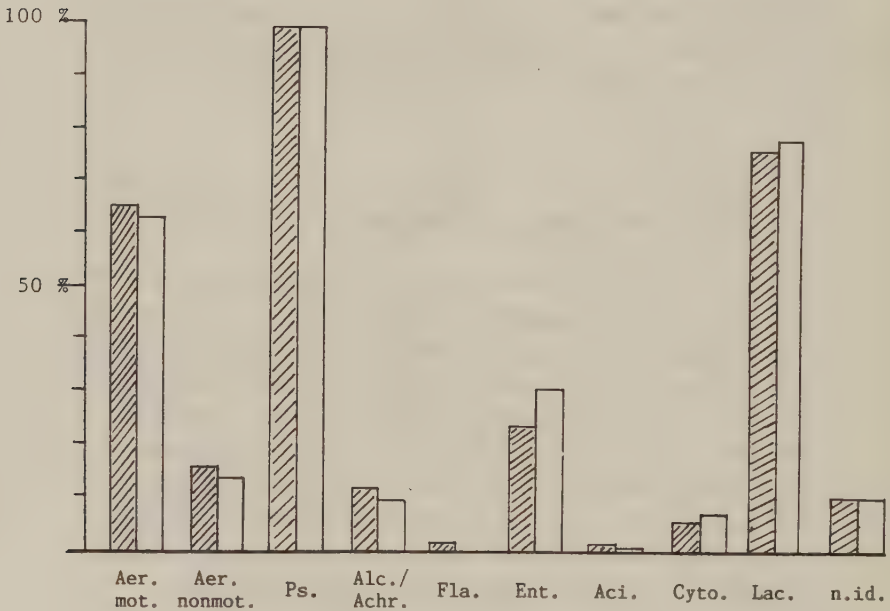
4.9. Nicht identifizierte Gram-positive Stäbchen

Insgesamt konnten 21 biochemisch untersuchte Gram-positive, Oxidase-negative, Catalase-positive Stäbchen nicht identifiziert werden. Diese Keime wuchsen in sehr unterschiedlichen Formen (weißliche, ocker-schmutzige, z.T. auch gelbliche Kolonien) auf Columbia-CNA-Agar. In einigen Fällen wurde Glucose weder oxidativ noch fermentativ abgebaut. Auf eine Einteilung in Gruppen oder eine Zuordnung zu bestimmten Gattungen wurde verzichtet, da dies wegen der stark variierenden biochemischen Reaktionsmuster nicht möglich war.

4.10. Saisonelle und geographische Verteilung der isolierten Bakterien

Diagramm 1: Prozentuale Häufigkeit der isolierten Keime bei den untersuchten Karpfen *

- *  untersuchte Fische zum Ende der Winterruhe (n = 110)
 untersuchte Fische gegen Ende des Sommers (m = 80)



Anm.: Aer. mot.	bewegliche Aeromonaden
Aer. nonmot.	unbewegliche Aeromonaden
Ps.	Pseudomonaden
Alc./Achr.	Alcaligenes/Achromobacter sp.
Fla.	Flavobacter sp.
Ent.	Enterobacteriaceae
Aci.	Acinetobacter sp.
Cyto.	Cytophaga/Flexibacter sp.
Lac.	Lactobacillus piscicola
n.id.	nicht identifizierte Keime

Tabelle 15: Verteilung der identifizierten Keime innerhalb der einzelnen Fischgruppen

	Aer. mot.	Aer. non- mot.	Ps.	Alc./ Achr.	Fla.	Ent.	Acı.	Cyto.	Lac.	n.id.
A/1 - A/10	++	+	+++	-	-	+	+	-	++	+
A/11 - A/20	++	+	+++	-	-	+	+	-	++	+
B/1 - B/10	++	+	+++	-	+	+	-	-	++	++
C/1 - C/10	++	+	+++	+	+	++	-	+	+++	-
C/11 - C/20	++	+	+++	-	-	-	-	-	+++	-
D/1 - D/10	+++	-	+++	+	-	++	-	-	++	+
E/1 - E/10	+++	+	+++	-	-	+	-	+	+++	-
E/11 - E/20	++	++	+++	+	-	-	-	++	++	-
F/1 - F/10	+++	-	+++	-	-	+	-	-	+++	+
F/11 - F/20	++	+	+++	-	-	+++	-	-	++	-
G/1 - G/10	+++	+	+++	+	-	+	-	-	++	++
G/11 - G/20	+++	+	+++	+	-	-	-	-	++	++
H/1 - H/10	++	+	+++	-	-	+	-	+	++	-
H/11 - H/20	++	+	+++	-	-	+	-	-	++	-
I/1 - I/10	+++	-	+++	-	-	-	-	-	++	-
J/1 - J/10	++	+	+++	+	-	+	-	+	+++	+
J/11 - J/20	++	+	+++	-	-	-	-	-	++	++
K/1 - K/10	++	+	+++	+	-	-	-	-	++	-
L/1 - L/10	++	+	+++	+	-	+	-	-	++	+

Anm.: - : bei keinem Fisch gefunden
+ : bei 1 - 3 Fischen gefunden
++ : bei 4 - 7 Fischen gefunden
+++ : bei 8 - 10 Fischen gefunden

Abkürzungen wie in Diagramm 1

5. Diskussion

Die Aufklärung einer weitgehend unbekannten, heterogenen Keimflora stellt den Untersuchenden vor eine Reihe von Problemen. Einerseits müssen die verwendeten Nährmedien relativ unspezifisch einem breiten Spektrum von Keimen das Wachstum erlauben, andererseits benötigen aber anspruchsvolle und schwierig zu kultivierende Keime i.d.R. besondere Nährmedien oder gar Anreicherungsverfahren, welche wiederum die natürlich vorhandene Zusammensetzung der Darmflora manipulieren würden.

Die Wahl fiel auf vier verschiedene Nährböden. Standard-I-Nähragar und CLED-Agar (Cystin-Lactose-Electrolyte Deficient Agar) besaßen keine besonderen selektiven Eigenschaften. Lediglich bei CLED-Agar sollte das Fehlen der Elektrolyte das Schwarmverhalten von möglicherweise vorkommenden *Proteus*-Arten unterdrücken.

Im Gegensatz dazu begünstigte die Anwendung von Endo-Agar selektiv das Wachstum Gram-negativer Keime (v.a. von *Enterobacteriaceae*), während die Zusätze von Colistin Nalidixinsäure im Columbia-CNA-Agar die Entwicklung des Gram-negativen Keimspektrums weitgehend unterdrückten und damit die Isolierung Gram-positiver Keime erleichterten. Der Gebrauch von Cytophaga-Agar nach Anacker und Ordal erfolgte nur in solchen Fällen, bei denen versucht wurde, Bakterien in Reinkultur zu erhalten, die aufgrund ihrer Fortbewegungsart auf eine Zugehörigkeit zur Gruppe *Flexibacter/Cytophaga* hatten schließen lassen.

Zur biochemischen Differenzierung der Keime dienten Fertigsysteme der Firmen Hoffmann-La Roche, Basel, und Api Bio Merieux, Montalieu Vercieu, Frankreich. Diese Systeme zeichnen sich v.a. durch eine einfachere Handhabung gegenüber herkömmlichen Bunten Reihen aus, bei welchen die getesteten Reaktionen in einzelnen Reagenzröhrchen geprüft werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Systeme sind entsprechende Computer-Codierlisten, die die Identifizierung der untersuchten Keime erleichtern. Allerdings beziehen sich die Angaben der Hersteller über den Gebrauch dieser Fertigsysteme auf höhere Inkubationstemperaturen (38°C).

HAHNEL et al. (1982) untersuchten die Auswirkungen von verschiedenen Inkubationstemperaturen auf die biochemischen Reaktionen von typischen und atypischen *Aeromonas salmonicida*-Stämmen. Dabei zeigte sich, daß Temperaturen von 18°C und 28°C kaum Auswirkungen auf die mit API 20 E erzielten Ergebnisse hatten. Lediglich bei einer Inkubationstemperatur von 11°C waren verlangsamte Reaktionen zu beobachten. Aus diesem Grund erschien die Auswertung der Ergebnisse bei einer Inkubationstemperatur von 20°C - 22°C und einer Inkubationsdauer von 48 Stunden als gerechtfertigt. Außerdem stellten HAHNEL et al. ihre mit API 20 E erzielten Ergebnisse denen mit herkömmlichen Testverfahren untersuchten Keimen gegenüber und konnten bei den meisten biochemischen Reaktionen Übereinstimmung erzielen.

McFADDIN (1980) verglich ebenfalls die Ergebnisse von Multitestsystemen mit herkömmlichen Testverfahren. Dabei ergab sich im Falle von Api Bio Merieux (API 20 E) eine Korrelation der Ergebnisse von ca. 90 - 100 %, bei Hoffmann-La Roche (Enterotube) von ca. 80 - 100 %.

Unter diesen Gesichtspunkten erfolgte die Bewertung der biochemischen Reaktionen nicht ausschließlich auf der Basis der von den Herstellern gelieferten Computer-Codierlisten, sondern v.a. nach den Angaben aus Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984, 1986) sowie nach den Angaben von COWAN und STEEL (1970) und von AUSTIN und AUSTIN (1987).

5.1. Aeromonaden

5.1.1. Bewegliche Aeromonaden

Zu den beweglichen Aeromonaden werden heute nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) die Species *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* und *Aeromonas sobria* gerechnet. Die in der Literatur lange Zeit gebräuchlichen Namen fischpathogener *Aeromonas*-Arten, wie *Aeromonas punctata*, *Aeromonas liquefaciens* oder *Aeromonas formicans*, sind als Synonyma für *Aeromonas hydrophila* zu betrachten.

Die motilen Aeromonaden sind ubiquitäre Wasserbewohner und gehören zur gewöhnlichen Mikroflora von Süßwasserfischen und damit auch zur Darmflora des Karpfens. Dementsprechend ist ihr Vorkommen im Darm von 63 % der untersuchten Fische nicht außergewöhnlich. Ähnliche Ergebnisse hatten auch die Untersuchungen von KREMPL (1959); MATTHEIS (1964) und AOKI (1974) an Karpfen, sowie die Arbeiten von YOSHIMIZU (1976) und SAKATA (1980) an Salmoniden ergeben.

Lange Zeit wurden bewegliche Aeromonaden in Zusammenhang mit der Infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens gesehen. 1971 isolierten FIJAN et al. ein Rhabdo-Virus als Erreger und ordneten dem Krankheitskomplex der Infektiösen Bauchwassersucht zwei unterschiedliche Krankheiten zu: die durch das Rhabdovirus carpio verursachte Frühjahrsvirämie des Karpfens (spring viraemia of carp, SVC) und die bakteriell bedingte Erythrodermatitis des Karpfens (carp erythrodermatitis, CE). Dennoch blieb die Bedeutung beweglicher Aeromonaden als Verursacher von Sekundärinfektionen bei der SVC und anderen Viruserkrankungen unbestritten.

Weiterhin gilt *Aeromonas hydrophila* als fakultativ pathogener Erreger von hämorrhagischen Septikämien, wovon alle Süßwasserfische betroffen sein können (AMOS, 1985). Krankheitsausbrüche treten im allgemeinen nur unter ungünstigen Umweltbedingungen auf. Die Krankheit verläuft mit relativ unspezifischen Symptomen, wie Hämorrhagien an Bauch- und Seitenflächen (chron. Verlauf), Geschwüren (akuter Verlauf), oder als allgemeine Septikämie (perakuter Verlauf). Ob der Darm bei Krankheitsausbruch eine Eintrittspforte darstellen kann, ist nicht sicher, erscheint aber wahrscheinlich.

Keiner der Fischbesitzer, die ihre Karpfen zur Verfügung stellten, hatte über akute Krankheitsausbrüche oder vermehrte Todesfälle berichtet. Ebensowenig wurden an den untersuchten Fischen Krankheitssymptome festgestellt.

Die hohe Anzahl der gefundenen *Aeromonaden* im Darm der untersuchten Fische läßt den Schluß zu, daß diese Keime zur natürlichen Darmflora zählen und - solange das natürliche Gleichgewicht nicht gestört ist - ohne Folgen für den betroffenen Wirt bleiben.

5.1.2. Unbewegliche *Aeromonaden*

Eine besondere Rolle als fischpathogene Keime spielen die unbeweglichen Vertreter der *Aeromonaden*. Nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) gliedert sich diese als *Aeromonas salmonicida* bezeichnete Species in drei Subspecies: *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes* und *Aeromonas salmonicida* ssp. *masoucida*.

Der Furunkuloseerreger der Salmoniden, *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, wächst unter Bildung eines braunen Pigments auf Trypton-Soja-Agar oder Standard-

I-Agar, während *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes* und ssp. *masoucida* diese Eigenschaft nicht zeigen.

In 16 der 19 untersuchten Fischgruppen wurden i.d.R. bei jeweils mehreren Fischen unbewegliche Keime gefunden, die zu den *Aeromonaden* zählten. Eine Pigmentbildung konnte nicht festgestellt werden. Allerdings weisen einige Autoren darauf hin, daß diese Eigenschaft kein verlässliches Zeichen für die Differenzierung von *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* darstellt, da sowohl pigmentbildende *Aeromonas hydrophila*-Stämme (PATERSON, 1974, ALLEN et al., 1983) als auch nicht-pigmentbildende Stämme von *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* existieren (EVELYN, 1971). Weiterhin kann die Pigmentbildung durch andere Keime gehemmt werden (CORNICK et al., 1969).

Nicht-pigmentierte, sog. atypische *Aeromonas salmonicida*-Stämme, wurden außer bei Salmoniden auch bei einer Reihe anderer Fische beschrieben, wie z.B. Elritze (HASTEIN et al., 1978), Karpfen (CSABA et al., 1981) oder Aal (OHTSUKA et al., 1984).

Gestützt auf umfangreiche Literaturangaben und detaillierte Untersuchungen schlugen McCARTHY und ROBERTS (1980) eine andere Einteilung der unbeweglichen *Aeromonaden* vor:

Gruppe 1: Typische *Aeromonas salmonicida*-Stämme:

Aeromonas salmonicida ssp. *salmonicida*

Gruppe 2: Aus Salmoniden isolierte atypische Stämme:

Aeromonas salmonicida ssp. *achromogenes*

Gruppe 3: Aus Nicht-Salmoniden isolierte atyp. Stämme

Aeromonas salmonicida ssp. *nova*

Nach diesem Klassifikationsschema wären die im Darm der Karpfen gefundenen unbeweglichen *Aeromonaden* wie in Kap. 4.1. als *Aeromonas salmonicida* ssp. *nova* zu bezeichnen.

Die zitierte Literatur berichtet allerdings nicht über unbewegliche Aeromonaden im Darm von Süßwasserfischen. So beschreiben KREMPL (1959) und MATTHEIS (1964) alle von ihnen isolierte Aeromonas-Stämme als z.T. lebhaft beweglich.

Das Vorkommen unbeweglicher, atypischer Aeromonas - Arten erscheint aber gerade von besonderer Bedeutung, da diese als Erreger verschiedener Fischkrankheiten gelten, wie der Ulcer Disease der Goldfische (ELLIOTT et al., 1980, SHOTTS et al., 1980), der Fleckenseuche der Weißfische (WIEDEMANN, 1980) und der Erythrodermatitis des Karpfens (BOOTSMA et al., 1977 a, b, FIJAN et al., 1978 und WIEDEMANN, 1979). Die CE (Synonyma: Chronische oder Geschwürsform der Bauchwassersucht) ist innerhalb der Karpfenpopulation weit verbreitet und verläuft unter Bildung tiefgreifender Hautulcera. Falls es zu einer Heilung kommt, bleiben umfangreiche Narben, welche die Verkaufsfähigkeit der betroffenen Fische erheblich schmälern. Die CE geht mit einer variierenden Morbidität und Mortalität einher und tritt häufig in Zusammenhang mit SVC-Infektionen oder nach Überwinterung unter ungünstigen Bedingungen auf (ROBERTS und SCHLOTFELDT, 1985).

SCHULZ und BULLING (1981) untersuchten 72 an CE erkrankte Karpfen und isolierten jedoch in keinem Falle unbewegliche Aeromonaden, sondern neben Aeromonas hydrophila v.a. Pseudomonaden und Enterobakterien.

In gleicher Weise berichteten KÖRTING und NEUKIRCH (1986) über eine zunehmende Zahl von beweglichen Aeromonaden und Pseudomonaden, die bei CE-Erkrankungen neben dem typischen Erreger, Aeromonas salmonicida ssp. nova, isoliert werden konnten.

SCHULZ und BULLING (1981) untersuchten weiterhin die Erythrodermatitis-Isolate von BOOTSMA et al. (1977) und WIEDEMANN (1979), konnten aber die Zuordnung der Keime zur Species *Aeromonas salmonicida* nicht bestätigen, da sie bei beiden Stämmen Beweglichkeit feststellten. Die Ursache hierfür lag in unterschiedlichen Verfahren zur Prüfung der Motilität. Außerdem lösten SCHULZ und BULLING mit den Keimen, die sie aus kranken Fischen isoliert hatten, in Pathogenitätsversuchen erneut das Krankheitsbild der CE aus. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß es sich bei CE um keine spezifische Infektion des Karpfens handelt, sondern die Krankheit durch verschiedene Erreger hervorgerufen werden kann, unter denen *Aeromonas hydrophila* eine vorherrschende Rolle spielt.

HEUSCHMANN-BRUNNER (1974) wertet die Beweglichkeit der Aeromonaden bemerkenswerterweise nicht als Zeichen zur Differenzierung von *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas salmonicida*. Nach ihrer Meinung existieren auch in der *Aeromonas hydrophila* - Gruppe unbewegliche, geißellose Formen.

Im Hinblick auf die eben erwähnten Aspekte ist das Vorkommen von unbeweglichen Aeromonaden im Karpfendarm unter Vorbehalt zu interpretieren. So muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß es sich bei diesen Keimen um unbewegliche Varianten von *Aeromonas hydrophila* handelte oder eine vorhandene Beweglichkeit im Nativpräparat nicht erkennbar war. Allerdings erscheint dies nicht sehr wahrscheinlich, da einerseits das Auftreten einer unbeweglichen Variante von *Aeromonas hydrophila* an geographisch und zeitlich sehr unterschiedlichen Punkten außergewöhnlich wäre, andererseits bei allen Keimen, die als *Aeromonas hydrophila* identifiziert wurden, die Beweglichkeit eindeutig feststellbar war.

Unter diesen Gesichtspunkten erscheint eine Klassifizierung der isolierten unbeweglichen Aeromonaden als *Aeromonas salmonicida* ssp. nova als gerechtfertigt. Die Bedeutung dieses Keimes als Erreger der CE ist in den Standardwerken der Literatur (AMLACHER, 1986, ROBERTS und SCHLOTFELDT, 1985, AUSTIN und AUSTIN, 1987) unbestritten. Als Überträger, bzw. Wegbereiter der Krankheit werden blutsaugende Parasiten, wie Egel oder Karpfenläuse, vermutet, da der Keim die unverletzte Haut nicht zu durchdringen vermag.

Möglicherweise könnte der Darm ein Reservoir für die Erreger darstellen. Das gehäufte Auftreten der Krankheit nach dem Überwintern könnte dadurch mit dem Beginn der Futteraufnahme und der damit verbundenen vermehrten Ausscheidung von Bakterien ins Wasser in Zusammenhang gebracht werden. Weitere Studien werden sicher genauere Aufschlüsse über die Epizootiologie der CE geben.

5.2. Pseudomonaden

Da Pseudomonaden als ubiquitäre Wasser- und Bodenkeime angesehen werden, die maßgeblich am Abbau organischer Substanzen in Wasser und Schlamm beteiligt sind, war es nicht überraschend, daß sie im Darmtrakt nahezu aller untersuchten Karpfen (98 %) gefunden wurden.

Pseudomonaden im Darm von Karpfen wurden auch von MATTHEIS (1964) und AOKI (1974) beschrieben, während KREMPL (1959) von Keimen dieser Gattung nicht berichtet. Jedoch dürften nach den Ergebnissen seiner biochemischen Untersuchungen ein Teil der als Aeromonaden klassifizierten Keime auch als Pseudomonaden einzuordnen sein.

Der Vergleich mit anderen Süßwasserfischen (Tabelle 4) zeigt, daß der prozentuale Anteil der Pseudomonaden beispielsweise im Darm von Salmoniden mit 0 - 29 % wesentlich geringer als der bei Karpfen ist. Dies kommt mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das Verhalten bei der Nahrungsaufnahme beider Fischgruppen zustande. Der Karpfen nimmt im Gegensatz zur Forelle seine Nahrung direkt vom Teichboden auf. Vermutlich sind auch unterschiedliche Wasserqualitäten, d.h. eine in der Regel höhere organische Belastung von Karpfenteichen im Vergleich zu Forellenteichen ausschlaggebend (BOHL, 1982).

Fischpathogene Bedeutung erlangen die Pseudomonaden - wie die beweglichen Aeromonaden - v.a. als Sekundärerreger und als Erreger bakterieller hämorrhagischer Septikämien. Daneben werden zwei Vertreter der Pseudomonaden für besondere Krankheiten verantwortlich gemacht. So gab es in Japan durch die von *Pseudomonas anguilliseptica* verursachte Red Spot Disease große Verluste bei Aalen (AMOS, 1985). *Pseudomonas fluorescens* wird dagegen in Zusammenhang mit dem als "Fin Rod" oder "Tail Rod" bezeichneten Krankheitsbild genannt. Die Krankheit kann eine Reihe von Fischen betreffen, wie z.B. Schleie, Goldfisch, Grasfisch, verschiedene andere Cypriniden und möglicherweise auch Regenbogenforellen und manifestiert sich in umfangreichen Nekrosen an Schwanz und Flossen (AUSTIN und AUSTIN, 1987).

MATTHEIS (1964) identifizierte zwar einen erheblichen Teil der Pseudomonaden im Karpfendarm als *Pseudomonas fluorescens*, in dieser Untersuchung erwiesen sich jedoch die überwiegende Mehrheit der isolierten *Pseudomonas*-Keime als *Pseudomonas putrefaciens* und *Pseudomonas putida*.

5.3. Achromobacter sp./Alcaligenes sp./Pseudomonaden ungeklärter Zuordnung

Die in Kapitel 4.3. beschriebenen Keime wurden zu einer Gruppe zusammengefaßt, da eine eindeutige Zuordnung aufgrund ihrer biochemischen Reaktionen nicht möglich war. Vertreter dieser Gruppe werden als natürliche Wasserbewohner angesehen. Die geringe Anzahl der Isolate läßt daher auf ein zufälliges Vorhandensein im Darm schließen. Die zitierte Literatur beinhaltet z.T. sehr unterschiedliche Angaben über den prozentualen Anteil von Achromobacterkeimen in der Darmflora (vgl. Tabelle 3). Dies liegt vermutlich an unterschiedlichen Klassifikations- und Zuordnungskriterien dieser taxonomisch umstrittenen Gruppe. So wird das Genus Achromobacter in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) nicht genannt. In der Literatur finden sich auch keine Angaben über eine fischpathologische Bedeutung dieser Keime.

5.4. Flavobacter sp.

Auch diese Gruppe von Keimen wird als normale Wasserbewohner angesehen. Da lediglich in zwei Fällen Flavobakterien isoliert wurden, erscheint auch ihr Vorkommen im Darm als zufällig. Der Vergleich mit den in der Literatur zitierten Angaben zeigt (vgl. Tabelle 3), daß auch bei anderen Fischen der prozentuale Anteil dieser Bakterien an der Darmflora gering ist.

Flavobakterien wurden v.a. im Zusammenhang mit der Bacterial Gill Disease genannt. Nach heutigen Erkenntnissen ist eine bakterielle Ätiologie jedoch äußerst fraglich. Vielmehr dürfte diese Krankheit durch ungünstige Umwelteinflüsse verursacht werden, während die Bakterien sekundär die bereits geschädigten Kiemen besiedeln (ROBERTS und SCHLOTFELDT, 1985).

5.5. Enterobacteriaceae

Das Vorkommen von Enterobakterien - einer im Darm von warmblütigen Tieren weit verbreiteten und gut untersuchten Gruppe - erscheint im Darm von Fischen als nicht unbedingt selbstverständlich. Jedoch zeigen die anschließend zitierten Literaturstellen, daß Vertreter dieser Gruppe in einer Vielzahl von Fischen gefunden wurden. Dabei ist bemerkenswert, daß der Anteil der Enterobakterien im Darm von Meeresfischen meist nur sehr niedrige Werte (0 - 5 %) erreicht (LISTON, 1957, COLWELL, 1962, AISO, 1968), während bei Süßwasserfischen die Häufigkeit der isolierten Enterobacteriaceae mit ca. 20 - 45 % der Isolate deutlich höher lag (TRUST und SPARROW, 1974, AOKI und WATANBE, 1974, YOSHIMIZU, 1976 a,b, NIETO; 1984, SAVVIDIS, 1984).

In dieser Arbeit wurden Enterobakterien (nicht identifizierte Vertreter eingeschlossen) in 55 Fischen gefunden. Dies entspricht einem Anteil von 28 %. Davon wurden ca. 30 % als Enterobacter agglomerans (45 %, rechnet man die in Kap. 4.5.4. beschriebenen Keime hinzu), 35 % als Escherichia coli und 14 % als Citrobacter freundii identifiziert.

Tabelle 16 gibt einen Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen von TRUST und SPARROW (1974), SAVVIDIS (1984) und AOKI und WATANABE (1974).

Tabelle 16: Prozentuale Verteilung der Enterobakterien aus dem Darmtrakt von Cypriniden, Salmoniden und Aalen.

	eigene Isolate	SAVVIDIS (1984)		TRUST u. SPARROW (1974)	AOKI u. WATANABE (1974)
	Karpfen	Cypriniden/Salmoniden		Salmoniden	Aale
Enterobakterien, gesamt	28 %	20 %	28,5 %	44 %	30 %
Enterob. sp.	30(45) %	48 %	46 %	81 %	24 %
Citrob. sp	14 %	33 %	38 %	1 %	17 %
E. coli	35 %	—	—	14 %	10 %
Y. ruckeri	—	—	6 %	—	—
Serratia sp.	—	—	—	3 %	—
Proteus sp.	—	18 %	—	1 %	25 %
Hafnia sp.	—	—	—	—	24 %
Klebsiella sp.	—	—	—	—	—

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Gruppe der Enterobakterien einen nicht unbeträchtlichen Anteil an der Gesamtflora des Darms von Süßwasserfischen hat, wobei offensichtlich keine besonderen Unterschiede zwischen Karpfen und anderen Fischarten bestehen. Daraus läßt sich folgern, daß der Anteil dieser Bakterien von der Art der Nahrungsaufnahme unabhängig ist und damit einen eigenständigen Teil der Darmflora darstellt. Weiterhin scheinen die Species Enterobacter, Citrobacter und E. coli die am häufigsten vertretenen Keime zu sein.

Beachtenswert ist jedoch der hohe prozentuale Anteil der E. coli (35 %) im Vergleich mit den Angaben der o.g. Autoren. Während diese Keime i.d.R. nur vereinzelt innerhalb der jeweiligen Fischgruppen zu isolieren waren, fanden sich in einer Gruppe aus der Oberpfalz (F/11 - F/20) bei sieben von zehn Fischen Coli-Bakterien im Darm. Dies ist möglicherweise auf eine massive fäkale Verunrei-

nigung des Teiches zurückzuführen. GELDREICH und CLARKE (1966) wiesen darauf hin, daß das Vorkommen fäkaler Keime durchaus einen Indikator für eine Verschmutzung des Gewässers darstellen kann. Handelt es sich dabei um eine hohe Belastung, so können nach Meinung der Autoren Fäkalkeime von Warmblütern noch nach 14 Tagen im Darm der Fische nachgewiesen werden.

Die Karpfen der Gruppe F/11 - F/20 stammten aus einem Teich von ca. 2-3 ha, der mit anderen in einem zusammenhängenden Teichgebiet von ca. 15 ha lag. Hinweise auf eine Verschmutzung, wie z.B. durch Jauche o.ä. lagen nicht vor. Vermehrt auftretende Krankheitsfälle waren ebenfalls nicht beobachtet worden.

In diesem Zusammenhang ist noch hervorzuheben, daß aus dem Verdauungstrakt der untersuchten Karpfen die folgenden fischpathogenen Vertreter der Enterobakterien nicht isoliert werden konnten: *Edwardsiella ictaluri* sp. nova, der Erreger einer septikämisch verlaufenden Erkrankung bei Katzenwelsen in den USA (MEYER und BULLOCK, 1973), *Edwardsiella tarda*, der Erreger einer in den 70er Jahren verlustreichen Erkrankung bei japanischen Aalen (WAKABAYASHI et al., 1973) und *Yersinia ruckeri*, der Erreger der Enteric Redmouth Disease (ROSS et al., 1966). Obwohl diese Krankheit gewöhnlich nur bei Salmoniden auftritt, konnten FUHRMANN et al. (1984) *Yersinia ruckeri* auch aus Aalen und Karpfen isolieren.

5.6. Cytophaga sp./Flexibacter sp.

Cytophagaceae und Flexibacter sp. (in der Literatur auch als Myxobakterien bezeichnet) werden als normale Wasserbewohner angesehen und gelten z.T. als fischpathogen.

So werden besonders zwei Vertreter dieser Gattung in Verbindung mit bakteriellen Erkrankungen genannt:

Flexibacter columnaris als Erreger der Columnaris oder Saddleback Disease, und Flexibacter psychrophila als Erreger der Coldwater oder Peduncle Disease.

Während Flexibacter columnaris für nahezu alle Süßwasserfische pathogen ist, treten Krankheitsfälle durch Flexibacter psychrophila v.a. bei Salmoniden auf (AMOS, 1985). Außerdem gelang es verschiedenen Untersuchern (vgl. Tabelle 3), Keime dieser Gattung auch im Darm gesunder Fische nachzuweisen. Der prozentuale Anteil an der Gesamtflora war jedoch i.d.R. gering. Dies liegt möglicherweise daran, daß diese Bakterien auch bei der Anwendung von Spezialnährböden nur schwer zu isolieren sind (ROBERTS und SCHLOTFELDT, 1985).

So stützt sich auch in dieser Arbeit die Beschreibung der Cytophaga/Flexibacter-Keime lediglich auf die Beobachtung langer, schlanker Gram-negativer Stäbchen, die im Nativpräparat gleitende Bewegungen ausführten. Die besonderen Wachstumsansprüche dieser Bakterien und das gleichzeitige massive Auftreten von schneller wachsenden Pseudomonaden ließen eine Isolierung in Reinkultur scheitern und verhinderten damit eine weitere biochemische Differenzierung. Ohne eine exakte Identifizierung bleiben aber Überlegungen über die Bedeutung dieser Keime rein spekulativ, so daß eine weitere Diskussion nicht möglich ist.

Hinweise auf eine pathogene Auswirkung waren jedoch an den untersuchten Karpfen nicht zu erkennen.

5.7. Acinetobacter sp.

Acinetobacter sp. sind in Wasser und Umwelt weit verbreitet. Sie unterscheiden sich von den Enterobakterien - obgleich ebenfalls Oxidase-negativ - durch einen strengen aeroben Glucoseabbau.

Keime dieser Gattung wurden auch im Darm von Fischen nachgewiesen (TRUST und SPARROW, 1974), scheinen aber nur einen geringen Anteil an der Gesamtfloora des Verdauungstraktes auszumachen.

Alle vier in dieser Arbeit isolierten Acinetobacter sp. stammten von Fischen aus einem Betrieb, so daß ihr Nachweis möglicherweise auf eine besondere regionale Häufung dieser Keime in der Umwelt zurückzuführen war.

Über Acinetobacter sp. als Erreger bakterieller Erkrankungen ist wenig bekannt, obgleich AUSTIN und ALLEN-AUSTIN (1985) diese Keime in die Reihe der fischpathogenen Bakterien stellen. Allerdings scheint die taxonomische Zuordnung unklar, da die Autoren die Klassifizierung der beschriebenen Keime selbst in Frage stellen.

5.8 Lactobacillus sp.

Obwohl Lactobazillen eine weite Verbreitung in der Natur besitzen, sind in der Literatur nur spärliche Angaben über diese Keime im Zusammenhang mit der Mikroflora von Fischen zu finden. So setzt sich der meist geringe Anteil Gram-positiver Keime im Intestinaltrakt i.d.R. aus Kokken, coryneformen Keimen oder nicht näher bestimmten Gram-positiven Stäbchen zusammen.

In dieser Arbeit wurden keine Gram-positiven Kokken gefunden, obgleich die verwendeten Nährmedien durchaus für deren Isolierung geeignet waren. Das Vorkommen Gram-positiver, als Lactobazillen identifizierter Stäbchenbak-

terien stellt dagegen bei 76 % aller hier untersuchten Karpfen einen außergewöhnlich hohen Anteil dar. Die Eigenschaften der gefundenen Keime zeigten eine weitgehende Übereinstimmung mit den biochemischen Reaktionen der von HIU et al. (1984) und MICHEL et al. (1986) isolierten Lactobazillen. Aus diesem Grund wurde auch die von HIU et al. geprägte Bezeichnung *Lactobacillus piscicola* übernommen, obwohl dieser Name nicht in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) verzeichnet ist.

Bemerkenswerterweise gelang die Isolierung dieser Keime nur auf Columbia-CNA-Agar. Dieser für Gram-positive Keime selektive Nährboden konnte das Wachstum des Gram-negativen Keimspektrums weitgehend unterdrücken und so eine Überwucherung der langsam wachsenden Lactobazillen verhindern. HIU et al. beobachteten zwar die Koloniebildung von Lactobazillen innerhalb von 24 - 48 Stunden, jedoch kultivierten sie ihre Stämme auf Trypton-Soja-Agar bei einer höheren Inkubationstemperatur (27°C).

Über eine fischpathologische Bedeutung von Lactobazillen war lange Zeit nichts bekannt. Erst die Arbeiten von ROSS und TOTH (1974) und CONE (1982) beleuchteten die Beteiligung dieser Keime an Fischkrankheiten. Nach den heutigen Erkenntnissen gilt *Lactobacillus piscicola* als Erreger der sog. Pseudokidney Disease. Diese Krankheit befällt v.a. Salmoniden und verläuft mit unterschiedlichen Symptomen, wie Ascites, Splenomegalie, Abszesse in der Muskulatur oder als generalisierte Septikämie. Obwohl Krankheitsfälle bisher nur bei Salmoniden beobachtet wurden, ist nicht auszuschließen, daß möglicherweise alle Süßwasserfische für den Erreger empfänglich sind (AMOS, 1985).

5.9. Verteilung der isolierten Bakterien

Die Zusammensetzung des Keimspektrums innerhalb der einzelnen Fischgruppen spiegelt in groben Zügen die der gesamten untersuchten Fischpopulation wider. Ausgesprochene geographische oder jahreszeitliche Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Einerseits waren die dominierenden Keime, wie *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. und *Lactobacillus piscicola* so häufig vertreten, daß sie gewissermaßen einen eigenständigen, unabhängigen Teil der Darmflora darstellten, andererseits fanden sich beispielsweise Flavobakterien oder *Acinetobacter* sp. zu selten, als daß man daraus eine geographische oder saisonale Abhängigkeit hätte ableiten können. Auch bei den Enterobakterien, die sicherlich zum eigenständigen Teil der Darmflora zu rechnen sind, war bis auf eine Fischgruppe kein besonderes Verteilungsmuster zu erkennen.

TRUST und SPARROW (1974) hatten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora von wildlebenden Salmoniden bei unterschiedlichen Standorten und Gewichtsklassen feststellen können. Weiterhin bekräftigte TRUST (1974), der Gesamtkeimgehalt im Darm während einer Hungerperiode sinke zwar, das Keimspektrum würde aber dadurch kaum verändert. Diagramm 1 macht deutlich, daß auch in dieser Studie kaum jahreszeitliche Unterschiede erkennbar waren. So hatten auch Fische, die mehrere Monate lang ohne Fütterung in Fischkästen überwintert wurden, im Prinzip die gleiche qualitative Zusammensetzung der Darmflora wie Fische nach der Nahrungsaufnahme.

Der Vergleich mit anderen Autoren (KREMPL 1959, MATTHEIS, 1964, AOKI, 1974 und SAVVIDIS, 1984) zeigte die weitgehende Übereinstimmung der Zusammensetzung des Gram-negativen Anteils der Darmflora mit den Ergebnissen dieser Autoren. Lediglich der Gram-positive Teil unterscheidet

sich durch den Nachweis von *Lactobacillus pisciola*, bzw. durch das Fehlen von Gram-positiven Kokken, wie sie z.B. von KREMPL (1953) beschrieben wurden. Diese Differenzen sind aber sicherlich auf verschiedene Isolierungsmethoden zurückzuführen.

Abweichende Aussagen über die Verteilung von Keimen entstehen daneben auch durch eine andere Bewertung der prozentualen Angaben. So beziehen sich in dieser Arbeit Prozentzahlen auf den Anteil der Fische, welche die genannten Keime beherbergten. In anderen Untersuchungen werden dagegen diese Angaben z.T. auf die Gesamtzahl der isolierten Bakterien bezogen, ohne deutlich zu machen, wie hoch die Häufigkeit des Keimes innerhalb der untersuchten Fischpopulation ist.

AUSTIN und AUSTIN (1987) nennen weitere Umstände, welche die Untersuchungsergebnisse beeinflussen können:

1. Art und Herkunft der Fische sowie der Einfluß äußerer Faktoren (Wasserqualität, Nahrungsangebot, Temperatur u.a.) auf deren Mikroflora.
2. Unterschiedliche Methoden bei der Isolierung (unterschiedliche Nährmedien, Inkubationszeiten und -temperaturen)
3. Unterschiedliche Methoden bei der Identifizierung (Anwendung biochemischer oder serologischer Methoden, Pathogenitätsversuche etc.)
4. Verschiedene Klassifikationskriterien.

Bei einer vergleichenden Betrachtung von bakteriologischen Arbeiten dieser Art, sollte die Bewertung der Untersuchungsergebnisse deshalb stets unter Berücksichtigung dieser Kriterien erfolgen.

Unter diesen Gesichtspunkten lassen sich dann auch grundsätzliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora erklären. Während beispielsweise bei Meeresfischen

die Vibrionen die Mehrzahl der Darmbakterien darstellen (vgl. Tabelle 3), sind bei Süßwasserfischen v.a. Aeromonaden, Pseudomonaden und Enterobakterien die dominierenden Keime. Dieses wurde auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Dennoch bleibt bemerkenswert, daß auch fischpathogene Keime im Darm der untersuchten Karpfen nachgewiesen wurden, ohne daß einer der Fische Anzeichen einer Krankheit erkennen ließ.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die aerobe und fakultativ anaerobe Darmflora von 190 Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) untersucht. Die Untersuchung konzentrierte sich auf die Zeit zum Ende der Winterruhe und zum Sommerende. Die Fische, deren Größe von K_1 bis K_3 reichte, stammten hauptsächlich von Teichwirtschaften aus der Oberpfalz und Mittelfranken. Dabei wurden nur solche Karpfen ausgewählt, die keine äußerlichen Anzeichen einer Erkrankung erkennen ließen.

Insgesamt wurden 579 Bakterien in Reinkultur isoliert, von denen 546 identifiziert werden konnten. Zu den dominierenden Keimen zählten v.a. verschiedene *Pseudomonas*-Arten, gefolgt von *Aeromonas hydrophila* und *Lactobacillus piscicola*. Ein Teil der isolierten *Aeromonaden* erwies sich als nicht beweglich und wurde als *Aeromonas salmonicida* sp. nova identifiziert. Weiterhin wurden verschiedene Enterobakterien (*Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii* und *E. coli*), sowie vereinzelt auch *Flavobacter* sp., *Cytophaga/Flexibacter* sp., *Alcaligenes/Achromobacter* sp. und *Acinetobacter* sp. nachgewiesen.

Obgleich bei den untersuchten Fischen teilweise fakultativ fischpathogene Bakterien gefunden wurden, zeigte keiner der untersuchten Karpfen Anzeichen einer Krankheit.

Eine Abhängigkeit des Keimspektrums von der geographischen Herkunft oder vom Zeitpunkt der Probeentnahme war nicht zu erkennen.

7. Summary:

Investigations on the aerobic and facultative anaerobic bacteria in the intestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.)

The aerobic and facultative anaerobic flora of the intestinal tract of 190 carps (*Cyprinus carpio* L.) was studied. The work was focussed on the time at the end of the winter rest and at the end of summer. The fish, sized from K_1 to K_3 , came mainly from fish-farms in Northern Bavaria (Mittelfranken and Oberpfalz). Only fish were selected, which showed no external signs of disease.

A total amount of 579 bacterial strains was isolated, of which 546 could be identified. The predominant bacteria were several strains of Pseudomonads, followed by *Aeromonas hydrophila* and *Lactobacillus piscicola*. A part of the *Aeromonas*-strains turned out to be not motile and was therefore identified as *Aeromonas salmonicida* ssp. nova. Furthermore various Enterobacteriaceae (*Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii* and *E. coli*) were isolated as well as sporadic *Flavobacter* sp., *Cytophaga/Flexibacter* sp., *Alcaligenes/Achromobacter* sp. and *Acinetobacter* sp. .

Although facultative pathogenic bacteria were found, none of the carps showed any signs of disease. The composition of the bacteria did not depend on the geographic location or on the time of examination.

8. Literaturverzeichnis

- Aiso, K., Simidu, U. und Hasuo, K. (1968):
Microflora in the Digestive Tract of Inshore Fish in Japan
J. gen. Microbiol. 52, 361 - 363
- Allen, D.A., Austin, B. und Colwell, R.R. (1983):
Aeromonas media, a New Species Isolated from River Water
Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 599 - 604
- Amlacher, E. (1986):
Taschenbuch der Fischkrankheiten, 5. Auflage
Gustav Fischer Verl. Stuttgart - New York, NY.
- Amos, K.H. (ed.) (1985):
Procedures for the Detection and Identification of Certain
Fish Pathogens. 3d. ed.
Fish Health Section, American Fisheries Society.
Corvallis, Oregon.
- Aoki, T. und Watanabe, T. (1973):
Studies of Drug-resistant Bacteria Isolated from Eel-pond
Water and Intestinal Tracts of the Eel (*Anguilla japonica*
and *Anguilla anguilla*)
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 39, 121 - 130
- Aoki, T. (1974):
Studies of Drug-resistant Bacteria Isolated from Water of
Carp-ponds and Intestinal Tracts of Carp
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 40, 247 - 254
- Aoki, T. (1975):
Effects of Chemotherapeutics on Bacterial Ecology in the
Water of Ponds and the Intestinal Tracts of Cultured Fish,
Ayu (*Plecoglossus altivelis*)
Japan. J. Microbiol. 19, 7 - 12
- Aschehoug, V. und Vesterhus, R. (1944):
Investigation of the bacterial flora of fresh herring.
Zbl. Bakt. II. Abt. 106, 5 - 27
- Austin, B. und Allen-Austin, D.A. (1985):
A review: Bacterial pathogens of fish
J. appl. Bact. 58, 483 - 506
- Austin, B. und Austin, D.A. (1987):
Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish.
Ellis Horwood Limited, Chichester

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (1984):
(Krieg, N.R. and Holt, J.G. eds.)
The Williams and Wilkins Co., Baltimore/London
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (1986):
(Buttler, J.P. and Vaughe, V.M. eds.)
The Williams and Wilkins Co., Baltimore/London
- Bohl, M. (1982):
Zucht und Produktion von Süßwasserfischen
BLV, München
- Bootsma, R., Fijan, N.N. und Blomaert, J. (1977):
Isolation and Preliminary Identification of the Causative
Agent of Carp Erythrodermatitis
Veter. Arhiv, Zagreb 47, 291 - 302
- Bootsma, R. und Blomaert, J. (1977):
Zur Ätiologie der Erythrodermatitis beim Karpfen
Cyprinus carpio L.
Fisch und Umwelt 5, 20 - 27
- Campbell, A.C. und Buswell, J.A. (1983):
The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*)
at different stages of fish development
J. appl. Bacteriol. 55, 215 - 223
- Colwell, R.R. (1962):
The Bacterial Flora of Puget Sound Fish
J. appl. Bact. 25, 147 - 158
- Cone, D.K. (1982):
A *Lactobacillus* sp. from diseased female rainbow trout,
Salmo gairdneri Richardson, in Newfoundland, Canada
J. Fish Dis. 5, 479 - 485
- Cornick, J.W., Chudyk, R.V. und McDermott, L.A. (1969):
Habitat and viability studies on *Aeromonas salmonicida*,
causative agent of furunculosis
Prog. Fish-Cult. 31, 90 - 93
zitiert nach Austin und Austin (1987)
- Cowan, S.T. und Steel, K.J. (1970):
Manual for the identification of medical bacteria
Cambridge University Press, Cambridge

- Csaba, Gy., Körmendy, B. und Békési, K. (1980):
Observations on the causative agent of carp erythrodermatitis in Hungary
The Proceedings of an International Seminar on Fish, Pathogens and Environment in European Polyculture, Szarvas, Hungary, p. 95 - 110
zitiert nach Austin und Austin (1987)
- Elliott, D. und Shotts, Jr., E.B. (1980):
Aetiology of an ulcerative disease in goldfish *Carassius auratus* (L.): microbiological examination of diseased fish from seven locations
J. Fish Dis. 3, 133 - 143
- Evelyn, T.P.T. (1971):
An aberrant strain of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* isolated from a marine host, the Sablefish (*Anoplopoma fimbria*) and from two species of cultured Pacific salmon.
J. Fish. Res. Bd. Can. 28, 1629 - 1634
- Fijan, N.N. (1972):
Infectious dropsy in carp - a disease complex
Proceedings of the Symposia of the Zoological Society of London, 30, 33 - 51
- Fijan, N.N. (1979):
Erythrodermatitis der Karpfen
In: Diagnose und Behandlung der Fischkrankheiten
München 24.-26. Okt. 1974, Dtschr. Vet. Med. Ges. Fachgr. Tierseuchenrecht, 1979
- Fuhrmann, H., Böhm, K.H. und Schlotfeldt, H.-J. (1984):
On the importance of enteric bacteria in the bacteriology of freshwater fish.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 42 - 46
- Geldreich, E.E. und Clarke, N.A. (1966):
Bacterial Pollution Indicators in the Intestinal Tract of Freshwater Fish
Appl. Microbiol. 14, 429 - 437
- Gilmour, A., McCallum, M.F. und Allan, M.C. (1976):
A study of the bacterial types occurring on the skin and in the intestines of farmed Plaice (*Pleuronectes platessa* L.)
Aquaculture 7, 161 - 172
- Goldmanowna, B. (1927):
Bakterje przewodu pokarmowego Karasia (*Carassius carassius* L.)
(Die Mikroflora des Darmtrakts von *Carassius carassius* L.)
Arch. Hydrobiol. i. Rybactwa 2, 183 - 196

- Hahnel, G.B. und Gould, R.W. (1982):
Effects of temperature on the biochemical reactions and
drug resistance of virulent and avirulent *Aeromonas salmonicida*
J. Fish Dis. 5, 329 - 337
- Håstein, T., Saltveit, S.J. und Roberts, R.J. (1978):
Mass mortality among minnows *Phoxinus phoxinus* (L.) in
Lake Tveitvatn, Norway, due to an aberrant strain of
Aeromonas salmonicida
J. Fish Dis. 1, 241 - 249
- Heuschmann-Brunner, G. (1974):
Aeromonas salmonicida der Erreger der Furunkulose
Münch. Beitr. Abw.-Fisch-Flußbiol. 25, 25 - 32
- Hiu, S.F., Holt, R.A., Sriranganathan, N., Seidler, R.J. und
Fryer, J.L. (1984):
Lactobacillus piscicola, a New Species from Salmonid Fish
Int. J. syst. Bacteriol. 34, 393 - 400
- Hunter, A.C. (1920):
Bacterial decomposition of salmon
J. Bact. 5, 353
zitiert nach Aschehoug und Vesterhus (1944)
- Körting, W. und Neukirch, M. (1986):
Forschung, Lehre und Diagnostik am Fachgebiet Fischkrankheiten
und Fischhaltung der Tierärztlichen Hochschule Hannover - IV.
Diagnostik
Fischer und Teichwirt 11, 327 - 329
- Kreml, H.K. (1959):
Beitrag zur aeroben Darmflora der Cypriniden
Inaug.-Diss., Tierärztl. Hochschule Wien
- Liston, J. (1954):
A Group of Luminous and Non-Luminous Bacteria from the
Intestine of Flatfish
J. gen. Microbiol. 12, i
- Liston, J. (1956):
Quantitative Variations in the Bacterial Flora of Flatfish
J. gen. Microbiol. 15, 305 - 314
- Liston, J. (1957):
The Occurrence and Distribution of Bacterial Types of Flatfish
J. gen. Microbiol. 16, 205 - 216
- MacFaddin, J.F. (1980):
Biochemical tests for the identification of medical bacteria
Williams and Wilkins Co., Baltimore/London

- Margolis, L. (1952):
Aerobic bacteria in the intestines and slime of the Pike
(*Esox lucius*) in Lake Monroe, Quebec
Rev. Canad. de Biol. 11, 20 - 48
- Margolis, L. (1953):
The effect of fasting on the bacterial flora of the
intestine of fish
J. Fish. Res. Bd. Can. 10, 62 - 63
- Mattheis, T. (1964)
Ökologie der Bakterien im Darm von Süßwassernutzfischen, I - IV.
Z. Fisch. N.F. 12, 507 - 535, 537 - 559, 561 - 580, 581 - 600
- McCarthy, D.H. und Roberts, R.J. (1980):
Furunculosis of fish - the present state of our knowledge
In: M.R. Droop und H.W. Jannisch (ed)
Advances of Aquatic Microbiology, Vol. 2
Academic Press Inc., New York
- Meyer, F.P. und Bullock, G.L. (1973):
Edwardsiella tarda, a new pathogen of channel catfish
(*Ictalurus punctatus*)
Appl. Microbiol. 25, 155 - 156
- Michel, C., Faivre, B. und Kerouault, B. (1986):
Biochemical identification of *Lactobacillus piscicola* strains
from France and Belgium
Dis. aquat. Org. 2, 27 - 30
- Newman, Jr., J.T., Cosenza, B.J. und Buck, J.D. (1972):
Aerobic Microflora of the Bluefish (*Pomatomus saltatrix*)
Intestine
J. Fish. Res. Bd. Can. 29, 333 - 336
- Nieto, T.P., Toranzo, A.E. und Barja, J.L. (1984):
Comparison between the bacterial flora associated with
fingerling rainbow trout in two different hatcheries in the
North-West of Spain
Aquaculture 42, 193 - 206
- Ohtsuka, H., Nakai, T., Muroga, K. und Jo, Y. (1984):
Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased eels
Fish Pathology 19, 101 - 107
- Okuzumi, M. und Horie, S. (1969):
Studies on the Bacterial Flora in the Intestine of Various
Marine Fish
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 35, 93 - 101
- Passovsky, A.I. (1939):
Bakterialnaja aerobnaja flora kischetschnika sdorowowo karpa
In: Les maladies de poisons
Inst. sc. onkr. de rech. piscioles 4, 45 - 72
zitiert nach Mattheis (1964)

- Paterson, W.D. (1974):
Biochemical and serological differentiation of several
pigment producing aeromonads
J. Fish. Res. Bd. Can. 31, 1259 - 1261
- Reed, G.B. und Spence, C.M. (1929):
The intestinal and slime flora of the haddock:
a preliminary report
Contr. Canad. Biol. 4, 259
zitiert nach Aschehoug und Vesterhus (1944)
- Roberts, R.J. und Schlotfeldt, H.-J. (1985):
Grundlagen der Fischpathologie
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- Ross, A.J., Rucker, R.R. und Ewing, W.H. (1966):
Descriptoin of a bacterium associated with redmouth disease
of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
Can. J. Microbiol. 12, 763 - 770
- Ross, A.J. und Toth, R.J. (1974):
Lactobacillus - a new fish pathogen?
Prog. Fish Cult. 36, 191
- Sakata, T., Okabayashi, J. und Kakimoto, D. (1980):
Variations in the Intestinal Microflora of Tilapia Reared in
Fresh and Sea Water
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 46, 313 - 317
- Savvidis, G. (1984):
Qualitative Untersuchungen über das Vorkommen von Entero-
bakteriazeen aus dem Darm von Süßwasserfischen unter beson-
derer Berücksichtigung von Yersinia ruckeri, dem ätiologischen
Agens der ERD (Enteric Redmouth Disease)
Inaug.-Diss., Tierärztl. Hochschule Hannover
- Schulz, D. und Bulling, E. (1981)
Beitrag zur Ätiologie der Erythrodermatitis des Karpfens
Zbl. Vet. Med. B 28, 450 - 482
- Sera, H. und Ishida, Y. (1972 a):
Bacterial Flora in the digestive tract of File-Fish
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 38, 651 - 652
- Sera, H. und Ishida, Y. (1972 b):
Bacterial Flora in the Digestive Tracts of Marine Fish - III.
Classification of the Isolated Bacteria
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 38, 853 - 858
- Shewan, J.M., Hobbs, G. und Hodgkiss, W. (1960):
A determinative scheme for the identification of certain
genera of gram-negative bacteria with special references
to the Pseudomonaceae
J. appl. Bacteriol. 23, 379 - 390

- Shotts, Jr., E.B., Talkington, F.D. Elliott, D.C. und McCarthy, D.H. (1980):
Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L.): characterization of the causative agent
J. Fish Dis. 3, 181 - 186
- Stewart, M.M. (1932):
The bacterial flora of the slime and intestinal contents of the haddock (*Gadus aeglefinus*)
J. Mar. biol. Ass. U.K. 18, 35
zitiert nach Aschehoug und Vesterhus (1944)
- Trust, T.J. und Sparrow, R.A.H. (1974):
The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes
Can. J. Microbiol. 20, 1219 - 1228
- Trust, T.J. (1975):
Facultativ anaerobic Bacteria in the Digestive Tract of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) Maintained in Fresh Water Under Defined Culture Conditions
Appl. Microbiol. 29, 663 - 668
- Ugajin, M. (1979):
Studies on the Taxonomy of Major Microflora on the Intestinal Contents of Salmonids
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 45, 721 - 731
- Wakabayashi, H. und Egusa, S. (1973):
Edwardsiella tarda (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) Associated with Pond-cultured Eel Diseases
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 39, 931 - 936
- Watanabe, K. (1960):
Bacterial Flora of Commercial Codfish
Nord. Vet. Med. 12, 541 - 554
- Wiedemann, H. (1979)
Erythrodermatitis der Karpfen - zur Isolierung und Klassifizierung des Erregers
Deutsche Tierärztl. Wschr. 86, 176
- Wiedemann, H. (1980):
Aeromonas salmonicida als Erreger der "Fleckenseuche der Weißfische"
Fisch und Umwelt 8, 59 - 67
- Yoshimizu, M., Kimura, T. und Sakai, M. (1976 a):
Studies on the Intestinal Microflora of salmonids - I.
The Intestinal Microflora of Fish reared in Fresh Water and Sea Water
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 42, 91 - 99

Yoshimizu, M., Kamiyama, K., Kimura, T. und Sakai, M. (1976 b):
Studies on the Intestinal Microflora of Salmonids - IV.
The Intestinal Microflora of Fresh Water Salmon
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 42, 1281 - 1290

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Dr. C. Pfeil-Putzien, die mir durch ihre persönliche Beratung und sachliche Anleitung immer eine große Hilfe war.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau R. Reitmeier, die mich durch ihre überaus freundliche Mithilfe bei allen Laborarbeiten unterstützte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Masahiro Ogawa und Herrn Busch, die mir bei der Übersetzung fremdsprachlicher Literaturstellen zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Gerhard Bausewein

geboren: 9. Dezember 1959

Eltern: Richard Bausewein
Erna Bausewein, geb. Hager

Schulbildung: 1966 - 1970 Volksschulverband Oberscheinfeld
1970 - 1979 Gymnasium Scheinfeld
allg. Hochschulreife 28.06.79

Grundwehrdienst: Juli 1979 - September 1980

Studium: WS 1980 - WS 1985 Tiermedizin an der
LMU München
Abschluß: Staatsexamen 29.11.85
Approbation 27.01.86

Dissertation: Ab Januar 1986 am Institut für Zoologie
und Hydrobiologie der Tierärztlichen
Fakultät der LMU München

